الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة منتوري قسنطينة

كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم علوم الطبيعة والحياة

أطروحة دكتوراة الدولة

الرقم الترتيبي

فرع فيسيولوجيا الحيوان

الرقم التسلسلي

تخصص صيدلة وسموم

عنوان الأطروحة

التنقيب عن ا زيئات الفعالة من النبتة الصحراوية *Chrysanthemum fuscatum* و*Colocynthis vulgaris* ودراسة الأثر الوقائي للنظام ا يباتولوجي وا يماتولوجي لدى ا رذان ا عاملة ضادات السل



تحت إشراف

الأستاذة الدكتورة بن عياش فضيلة - الأستاذة الدكتورة مرايحي زهية

أعضاء لجنة المناقشة

الرئيسة	الأستاذة الدكتورة	خاف ا نضرة	كلية علوم الطبيعة والحياة- جامعة منتوري قسنطينة
المقررة	الأستاذة الدكتورة	بن عياش فضيلة	كلية العلوم الدقيقة- جامعة منتوري قسنطينة
المقررة	الأستاذة الدكتورة	مرايحي زهية	كلية علوم الطبيعة والحياة- جامعة منتوري قسنطينة
الأعضاء	الأستاذ الدكتور	بن عياش سمير	كلية العلوم الدقيقة - جامعة منتوري قسنطينة
	الأستاذ الدكتور	عبد النور الشريف	كلية العلوم جامعة- باجي مختار عنابة
	الأستاذ المحاضر	لحول مصباح	كلية العلوم- جامعة جيجل

سنـــة 2006

المقدّمة 1

الفصل الكيميائي

DNPH	2,4-dinitrophenyl hydrazine
3-MC	3- methyl chlonthrane
DTNP	5,5 dithiobis-2-nitrobenzene
AcHD	Acetyl hydrazine
ADP	Adinosine diphosphate
ATP	Adinosine triphosphate
AH	Adinosine hydroixylase
ALT	Alanine transaminase
ALP	Alanine phosphatase
APND	Aminopyrine N-demethyase
AST	Aspartate transaminase
BSS	Balanced salt solution
BSA	Bovine serum albumin
CAT	Catalase
CYP450	Cyotochrome 450
CYP3A4	Cytochrome 3A4
DeO	Deuterium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DMFO	Dimethyl formamide
DPPH	Diphenyl-2-picrylhydrazine
GST	Glutathione-S-transferase
EH	Epoxide hydroxilase
ERMD	Erythromycin demethylase
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
FMS	Ferrous ammonium sulfate
FAD	Flavinadenine dinucleotide
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione disulfide
GR	Glutathine reductase
G6PD	Glutathione -6-phosphate dehydrogenase
Ht	Hematocrite
Hb	Hemoglobine
HMBC	Heteronuclear multiple
HPTLC	Highperformance thin layer chromatography
HRPase	Hors radish peroxidase
HD	Hydrazine
HO°_2	Hydroperoxyl
IC_{50}	Inhibition concentration
MDAa	Malonylaldehydedebis dimethylacetate
$O-CH_3$	Methoxyl
MTT	Methylthiotetrazolium
PMT	Mitochondrial permeability transition
TMPD	N,N,N´,N´-tetramethyl-p-pheneled diamine
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NBT	Nitroblue tetrazolium
NMR	Nuclear magnetic resonance
PMS	Phenazine methosulfate
PMSF	Phenyl methyl sulfonyl

PE	Phosphatedyl ehanolamine
PBS	Phosphate buffer saline
Ps	Phosphatidyl serine
Pc	Phosphatedyl choline
PNP-H	p-nitrophenol hydroxilase
ROS	Reactive oxygene species
RCR	Respiratory control acid
SDH	Succinic dehydrogenase
SOD	Superoxide dismutase
TBA	Thiobarbuteric acid
TCA	Trichloroacetic acid
UQ-10	Ubiquinol-10
UQ-9	Ubiquinol-9

الإهـــداء

- إ ناطقي الضاد مشارق الأرض مغار ا و كل من أيقن بأن لغة الضاد ر أحشائه الدر كامن.
- إ أستاذ الأساتذة والدي العزيز سليل عية العلماء ا سلم الذي علم أنّ ا ياة عقيدة وجهاد وتنبأ بفطرته الأبوية جال الصيدلة فأنشد صغ ة زهرة الأقحوان...
- إ من سدت حكمتها عطائها الصامت اللا متناهي صدية ووالد العزيزة......
- إ رفيق عمري زوجي الفاضل الأستاذ أ د مناد على كل ماأنفقه من جهد ووقت ومال لإ از هذه الأطروحة...
- إ كافة أفراد عائلة زوجي وأخص منهم سيدي العجال لدعاواته ا ارة ...
- إ قرة الع أبنائي حفظهم ا تقوى و اء الدين ....
- إ أخواي ال الدين و اليم وأخاوا ليلى ، حفصة ، حياة و أسرهم الكر ة...
- إ الذين رحلوا عنا بأرواحهم ولازلنا نعيش معهم بأرواحنا أخي الفاروق وا د تان جدتاي ر هم ا ....
- إ كافة أساتذ الذين تتلمذت على أيديهم وأخص منهم الأستاذ عبد الفتاح خليفة عبدالر ن ر ه ا ...
- إ روح كل شهيد وإ تضحيات كل اهد قدمت قربانا من أجلك يا وط العزيز دمت سا ا وآمنا وعزيزا ...

شكر وتقدير

الشكر للخالق عز وجل على نعمائه الـ لا تعد ولا ـصى

- شكر بالغ إ رئيس جامعة منتوري قسنطينة الأستاذ عبد ا ـميد جكون لتفانه أن تكون جامعة قسنطينة رائدة ا ال العلمي.

- أخص بالشكر الأستاذة اللتـ أ ـر إشرافهما بتوأمة بيولوجية وكيميائية الأستاذة بن عياش فضيلة و الأستاذة مرا ي زهية على تبنيهما موضوع البحث فكرة وإ ازا وسندا معنويا توج بأربع نشرات دولية.

- أنوه بدور ـنة ا ناقشة على قبو ا إثراء وتثمـ هذا العمل أخص منهم الأستاذ بن عياش لتكرمه بالنباتات ـت الدراسة والأستاذة خلف ا نضرة للقيام بتصنيف النباتات والأستاذ ـول مصباح ا قدمه من مساعادات وكذا الأستاذ عبد النور الشريف.

- ولا يفوتـ أن أنوه بدور الأستاذ الفاضل دندوقي حسـ صاحب البصمة الأو هذا البحث وصاحب النباتات ـت الدراسة. وأوجه شكري ا اص والأخوي للأستاذة مكيو رتيبة الـ كانت نعم الدعم مسـ الكيميائية.

- ثناء وشكر معـ إ الأستاذة الفاضلة وليدة راشد رئيسة البيولوجيا والبيئة وا تبخل بتمويل هذا البحث بالدعم ا ادي.

- جزيل الثناء والامتنان إ الأستاذ الفاضل سعيد حسـ هلال رئيس قسم ا ناعة وا يكروبيولوجيا والأستاذ إيهاب أبو الفتوح عميد كلية الصيدلة امعة الأزهر لتبـ هذا البحث والتوجيهه لنا إ ا خابر ا تخصصة.

- شكر خاص للأستاذ غواطي والأستاذ كابوش أ ـد ا ا قدماه لنا من مساعدات تقنية.

- شكر وامتنان للآستاذة امة بوريش امعة سطيف والأستاذ عايدة والأستاذة شهرة امعة منتوري ا أبدوه من تعاون علمي.

- ثناء معـ للأخت الفاضلة الأستاذة نادية ـلف والأستاذة دليلة ساطة والأستذة دليلة نعيمي للدعم ا عنوي.

- شكر خاص إ عائلـ الكر ة وزوجي الفاضل لصـ هم وأنا ـم ودعوا ـم ا ارة.


المقدمة

المقدّمة

لا أحد ينكر ما للصناعة الدوائية من أفضال في إنقاذ البشرية من ويلات الأوبئـة وآلام الآفـات المرضية، فلقيت بذلك رواجا وتوهجا، وبالرغم من أن هذه الصناعة تطالعنا بكل جديد مع التطـورات الصناعية، إلا أنها باتت تشكل هاجسا يؤرق البشرية لما لازمها من آثار جانبية و مضاعفات علاجيـة إثر الفعل التراكمي مما جعل منظمات الصحة الدولية (OMS) تنادي بالتعامل العقلاني والحـذر، بـل وتعالت الصيحات للاصطلاح مع الطبيعة والعودة إلى المنتجات الطبيعية و مشتقاتها التي تشكل 50% من العقاقير المتداولة إكلينيكيا (Velazquez وآخرون، 2003) لما تمتاز به النباتـات مـن خصـائص علاجية (Maud و Hanningto ، 2007).

يتسبب داء السل الذي عاد بقوة عبر العالم في موت ما يقـارب 1,9 مليـون سـنويا (Francis، 2006)، ولا يزال ال isoniazid أحد أهم مضادات السل المتداولة منـذ سـنة 1952 حتـى السـاعة بالجزائر كغيرها من دول العالم لما له من فعاليات معتبرة من الـ *Mycobacterium tuberculosi* إلاّ أن هذا النشاط العلاجي و حتى الوقائي للذين يعانون من داء السيدا، وقايـة لهـم مـن المضـاعفات المتوقعة، يزامنه غالبا التهابا كبديا يماثل الالتهـاب الكبـدي الفيروسـي (Bluck وآخـرون، 1975) وبالرغم من فوات ما يزيد عن 30 سنة من الجزم في هذه التسمية، إلاّ أن آليات حدوث هذه السمية لا زال يعتريها الغموض (Yue وآخرون، 2004)، و لعلى أكثر النظريات قبولا هو تحول أحد مستقلبات الـisoniazid (INH) وهو Monoacetylhydrazine (AcHD) إلـى مسـتقلب نشـط عبـر النظـام الستوكرومي (Zilly وآخرون، 1977) و تتفاقم هذه السمية في وجود الـ rifampicin (RMP) الـذي يوصف عادة إلى جانب الـ INH، محرضا بذلك النظام CYP2E1 المولد للجذور النشطة أوكسـيجنيا ROS (Clarck وآخرون، 1999).

إن الارتباط التساهمي للمستقلبات النشطة hydrazine أو acetyl hydrazine بالجزيئات الضخمة يخل بهيموستازيا الـhepatocyte والجهد الرودوكسي بالعضييات والنظام البيروكسيزومي.ينعكس هذا بأريلة للبروتينات السيتورزولية وبروتينات العضيات الميتوكوندرية والشبكة الأندوبلازمية كما يساهم تسرب الوسائط الأوكسيجينية النشطة في إستنفاذ العتاد الدفاعي للـhepatocyte مطورا الحالـة إلـى تدهن أو نخر مركزي. تملك الـhepatocyte آليات عدة للحد من هذا التـدخل بـإحتواء المسـتقلبات بالجيب الهيدروفوبي السيتوكرومي أو بالتثبت التساهمي مع أبو بروتين الهيم أو الحديد الهيمي. يتدخل الـepoxide hydrolase السيتوزولي والميكروزومي أو النووي في تحويل العديد من الهيدروكسـيلات ويدعم ذلك الإقتران الجلوتاتيوني.إنّ تنوع آليات إختلال الهيموستازيا والجهد الرودوكسـي يسـتدعي تنوع آليات التدخل الوقائي لذا فإن تعزيز الجهد الرودركسي للنظام السيتوكرومي والميتوكوندري يمنع تسرب قدر معتبر من الوسائط النشطة ويدعم الأنظمة الدفاعية كأثر وقائي.

وللحد من الآثار الجانبية لمضادات السل التي تؤخذ في شكل خريطة مكثفة ضـمن المخطط ـات العلاجية القياسية التي قد تصل إلى 18 شهرا انصب الاهتمام على محاولة تعزيز المعالجين بالأدويـة بشكل عام بمركبات مصنعة كيميائية كالـN-acetylcysteine والمثيونين والسيستيئين في الطب الوقائي لكونها تعتبر طلائع مهمة للجلوتاتيون (GSH). إلاّ أن اقتصار أثر N-acetylcysteine علـى الطـور الأول من إزالة السمية الكبدية، وكذا سمية الـcysteine علـى الخلايـا العصـبية (Freya وGarry ، 2001) حد من الاعتماد عليها قليلا كما أن التعامل مع السيلينيوم الذي يشكل عاملا مهما في نظام الـ peroxidase، أصبح حذرا لكونه يستنفذ الـ GSH بلجمه ثيولات الـ ـ cysteine (Sailaja وآخـرون، 2005).

إن محدودية فعل هذه الكيمياويات المصنعة دفع بالكثير من الباحثين إلى رفع شعار العـودة إلـى الطبيعة ومراجعة الطب التقليدي واقتباس وصفاته الشعبية واخضاعه للدراسات العلمية من حيث تحديد سميتها وحدودها الآمنة والجرعة وطريقة التعاطي وفترة التعاطي فنجم عن هـذا صـيدليات طبيعيـة كالصيدلية الصينية والصيدلية الهندية للمنتجات الطبيعية، ذات المأمونية الأوسع على النظام الحيـوي، كما يملك النبات الواحد العديد من المواد الفعالة التي يمكن أن تتدخل بالفعل التآزري في التصدي للخلل الفزيولوجي الناجم عن آليات معقدة.

تشكل الفلافونيدات إحدى أهم المستقلبات الثانوية للنباتات الوعائية أحد أهم المنتجات الطبيعية التي يعلق عليها الأمل كثيرا لما تتميز به من خصائص الفعل المانح للهيدروجين والأسر الجذري وتعزيـز الأنظمة المضادة للأكسدة ومخلبة المعادن الداخلة بتفاعلات Fenton وHarber-Weiss سـندا واعـدا للحفاظ على الهيموستازيا والأنظمة الرودوكسية (Halliwell ، 1991).

ومن أشهر هذه الفلافونيدات التي أجمع أكثر من 540 بحثا على مدى نجاعتهـا الـ ـ sylimarin المشتق من بذور نبات شوك الجمل *Cilybum marianum* والذي أدرج بأوروبا بشكل أقراص تجاريـا للإستشفاء من مختلف صور الالتهاب الكبدي (Ravi وآخرون، 2001). وقد اعتمدت كنباتات معينـة تنسب إلى مناطق معينة كوصفات طبية تختلف باختلاف آليات حدوث الالتهاب الكبدي، حيث اعتبرت جذور الـ*Picrorrhiza* معالجة للاحتباس الصفراوي والـ *Shisandri*n في علاج الالتهـاب الكبـدي المزمن ، وأبدى سن الأسد Dendelion دورا مانعا لليرقان وجالبا للشهية وأظهرت أوراق الـ Boldo دورا منشطا للكبد(Wren،1989). كما تم اللجوء إلى وصفات بشكل توليفات مثل Liv,52 الذي يحد من التليف الكبدي الفيروسي (Shih و آخرون، 2005).

تتنوع الفلورا الجزائرية بتنوع الأنماط المناخية والبيئية وتعتبر المناطق الصـحراوية بضـاياتها، مخازن للأصول الوراثية النباتية إذ يضم الغطاء النباتي بالصحراء الوسـطى والغربيـة مـا يقـارب الـ650 نوعا وبالصحراء الشمالية 500 نوعا، حوالي 25 % منها أصيل (Ozenda، 1958).

لقد وقع الاختيار علـى *Chrysanthemum fuscatum* إحـدى نباتـات ضـايات ورقلـة وكـذا *Colocynthis vulgaris* ضمن مخطط التنقيب وإجراء مسح على النباتات الصحراوية التي تبناها مخبر تثمين الموارد الطبيعية وتخليق المادة النشطة بيولوجيا بقسم الكيميـاء وذلـك بتقصـي آراء السـكان المحليين حول الاستعمال التقليدي للنباتات الصحراوية، وأدرجت الدراسة الحالية ضمن مشروع أبحاث الصحراء (مركز الأبحاث العلمية والتقنية بالمناطق الجافة CRSTRA) بغية الحصول على المركبـات الفعالة من هذه النبتة المتداولة كتابل غذائي ومخفض للحمى ومطهر للـدم. وقـد أدلـت الدراسـات المرجعية بأن جنس *Chrysanthemum* يتمتع بخصائص مضادة للالتهاب (UKiya وآخرون، 2001) ومضادة للبكتيريا (Shunying وآخرون،2005) و مضادة للأكسـدة و(Chen وآخـرون، 2005؛ Bor وآخرون، 2006) وواقي كبدي (Coprean وآخرون، 1991). إلاّ أن النوع *fuscatum* لـم يسـبق أن تعرض للدراسة الكيميائية ولا البيولوجية. وتستأثر الدراسة الحالية للمستخلص البيتانولي بالتنقيب عـن الفلافونيدات الفعالة بيولوجيا. وقد بوبت هذه الدراسة في فصلين:

1. الفصل الكيميائي ويضم عرضا مرجعيا عن كيمياء الفلافونيدات والتقنيات المستخدمة وعرض للنتائج التي تحدد بنى المركبات الفلافونيدية التي تم الوصول إليها.
2. الفصل البيولوجي ويضم:

- دراسات بيولوجية *in vivo* و*in vitro* للمستخلص البيتانولي لكل من *C . fuscatum* و*C vulgaris* ومقارنتها بالمستخلص البيتانولي لـ *Hertia cheirifolia*.
- دراسة التداخل البنيوي الوظيفي للمركبات الفلافونيدية مع آليات سمية الـ INH والـ RMP المستقلبات النشطة لـ INH (hydrazine وacetyl hydrazine).
- دراسة التداخل البنيوي للمركبات الفلافونيدية والأنظمة الرودوكسية لميتوكوندريا وميكروزوم الـ hepatocyte (*in vitro*).
- دراسة الفعل الوقائي على النظام الهيماتولوجي.
- رصد الإستجابة البنيوية لعضيات الـ hepatocyte من خلال الدراسات المجهرية (مجهر ضوئي و مجهر إلكتروني) وتحاليل الـ Western blotting.

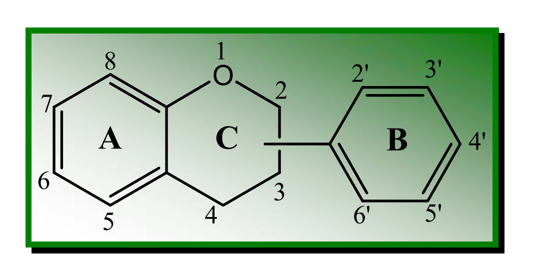

الفصل الكيميائي

1 الفلافونيدات

تشكل الفلافونيدات قسما معتبرا من الجزيئات البوليفينولية المتنوعة، تم حصر منهـا حاليـا مـا يقارب 4674 بنية (Chen وآخرون، 2005). وهي مركبات يتكون هيكلها من 15 ذرة كاربون، وتقسم بنيويا إلى 15 عائلة أهمها مايلي : الفلافون ، الفلافونول ، الفلافانول ، الأيزوفلافون ، الشـالكون ، الأورون ، الأنثوسيان .ويمكن لهذه المركبات أن توجد بصورة حرة وتعرف بالأجليكونات و بصـورة جليكوزيدات (Elliot، 1984) كما هومدون بالجدول (1.C). إن أول من أشـار إلـى الفلافونيـدات هو Geissman (1955) وذلك لتعريف الصبغات المهيكلة بـ C6-C3-C6 (مماثلا للفلافـون). وقـد أشتق إسم الفلافونيد من الإسم الإغريقي Flavus والذي يعنـي اللـون الأصـفر (Sanni Sauving ، 1952).

1 .1. التصنيف والتوزيع

تنتشرالفلافونيدات بشكل مفرط على مستوى النباتات الراقية خاصة على مستوى بعض العـائلات مثل المركبة والقرعية والخيمية، و يمكن أن تتواجد على مستوى كل من الأوراق، الأزهار، الجـذور، القاف، البذور، حبوب الطلع (Jurd وHorowitz، 1962). وقد تكون منصهرة داخل فجوات كما هـو حال الـ Heterosides أو كمركبات بلاستيدية. تتميز هذه النواتج الأيضية بامتلاكها نـواتين بنـزينيتين تعرف إحداهما بالنواة A والأخرى بالنواة B ترتبطان بسلسلة ثلاثية الكربون كما يدلي بذلك الشكل (1.C).



شكل(1.C): الهيكل الفلاڤونيدي

تتدخل الفلافونيدات كمضادات أكسدة على مستوى كيمياء النبتة، كما تعتبر ضـابطات أنزيميـة وطلائع للمواد السامة والصبغات (Middleton ، 1996). كما يمكن لها أن تتدخل في تنظـيم النمـو النباتي من خلال تداخلها مع مختلف الهرمونات النباتية. وتلعب دور الواقيات من الإصابات الطفيليـة أو البكتيرية (Middleton، 1996)، وتحمي أيضا النبات من تأثير الإشـعاعات الضـارة لخاصـيتها

الإمتصاصية للأشعة فوق البنفسجية (Bruneton ، 1993). وبالرغم من اقتصارها على عالم النبـات فإن عالم الحيوان لا يخلو منها كلية ، حيث سجل حضورها على مستوى الغـدد الإفرازيـة المميـزة لرائحة حيوان القندس (Starvic وMatula، 1992). وسجل وجود الـ chrysin وquerceting وgalanging بـpropolis النحل إذ تخلقها هذه الحشرات بفضل أنزيماتها اللعابية انطلاقا من بـراعم بعـض أشـجار السندر والصنوبر (Attaway ، 1994).

جدول(1.C): أقسام الفلافونيدات

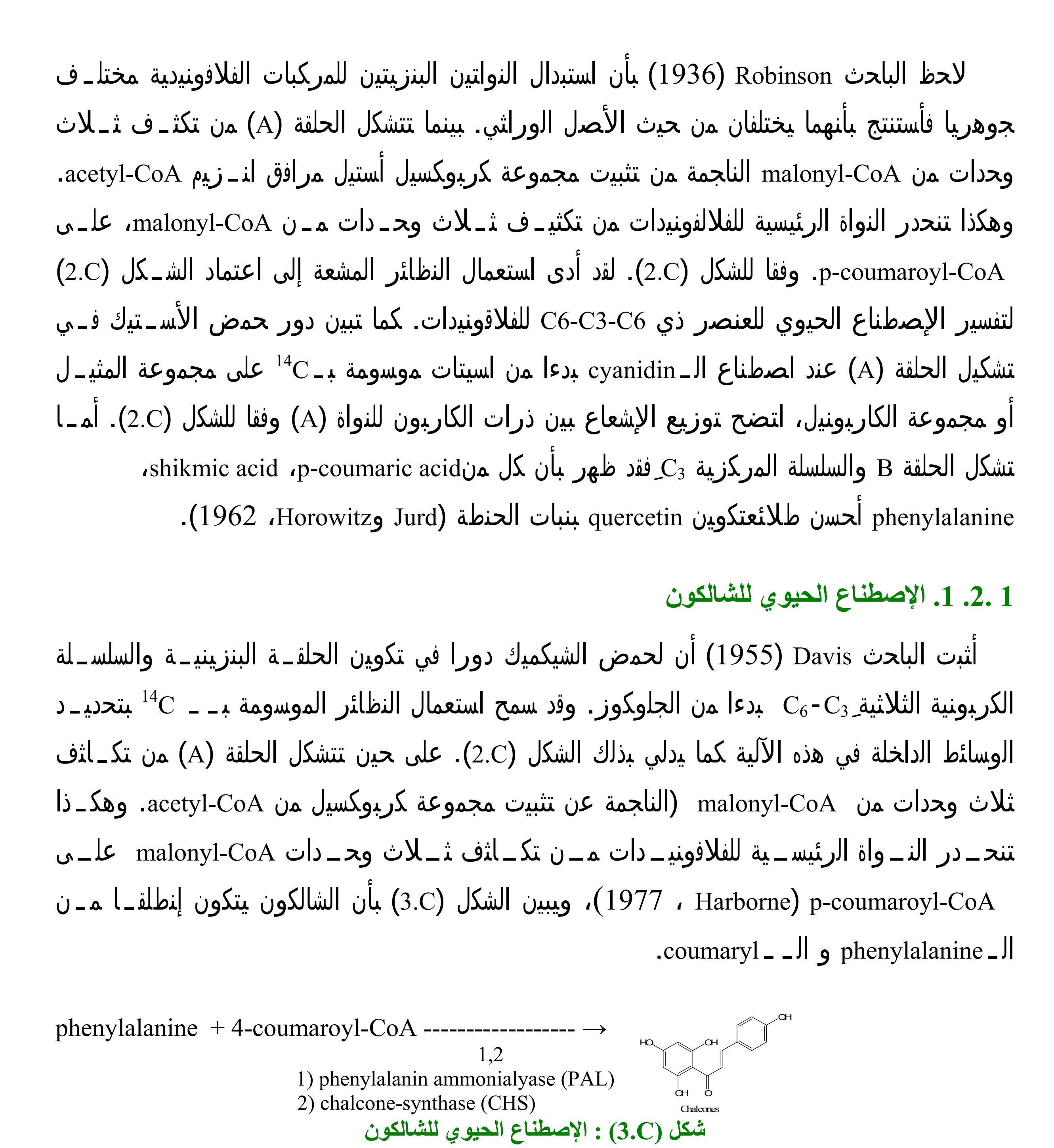
المشتقات	البنية	أسم العائلة	توزيع OH	الاسم
2-phenyl chromone		R = H Flavone	5, 7, 4' 5, 7, 3', 4'	Apigenin Luteolin
		R=OH Flavonol	5, 7, 4' 5, 7, 3', 4'	Kaempferol Quercetin
		R = H Flavanone (dihydroflavone)	5, 7, 4' 7, 3', 4'	Naringenin Butin
		R=OH Flavanonol (dihydroflavonol)	7, 3', 4' 5, 7, 3', 4'	Fustin Taxifolin
2-phenyl chromanes		R = H Catechin (flavonol-3)	5, 7, 3', 4', 5' 5, 7, 3', 4'	Gallocatechin Catechin
		R=OH Leucoanthocyanidin (flavandiol-3,4)	5, 7, 3', 4' 5, 7, 3', 4'	Leucocyanidin Leucodelphinidin
Flavyliums		R = H Flavylium (Anthocyan)	5, 7, 4' 5, 7, 3', 4'	Apigenidin Luteolidin
		R = OH (Anthocyanidin)		Cyanidin Delphinidin
3-phenyl chromone		Isoflavone	7, 4' 5, 7, 3', 4'	Daidzein Orobol
Chalcone		Chalcone	2', 4', 3, 4 2', 3', 4', 3, 4	Butein Okanin
Aurone		Aurone	6, 3', 4' 6, 7, 3',4'	Sulphuretin Maritimetin

1. 2. الاصطناع الحيوي

لاحظ الباحث Robinson (1936) بأن استبدال النواتين البنزيتين للمركبات الفلافونيدية مختلف جوهريا فأستنتج بأنهما يختلفان من حيث الأصل الوراثي. بينما تتشكل الحلقة (A) من تكثف ثلاث وحدات من malonyl-CoA الناجمة من تثبيت مجموعة كربوكسيل أستيل مرافق انزيم acetyl-CoA. وهكذا تنحدر النواة الرئيسية للفلافونيدات من تكثيف ثلاث وحدات من malonyl-CoA، على p-coumaroyl-CoA. وفقا للشكل (2.C). لقد أدى استعمال النظائر المشعة إلى اعتماد الشكل (2.C) لتفسير الإصطناع الحيوي للعنصر ذي C6-C3-C6 للفلاقونيدات. كما تبين دور حمض الأستيك في تشكيل الحلقة (A) عند اصطناع الـ cyanidin بدءا من اسيتات موسومة بـ ^{14}C على مجموعة المثيل أو مجموعة الكاربونيل، اتضح توزيع الإشعاع بين ذرات الكاربون للنواة (A) وفقا للشكل (2.C). أما تشكل الحلقة B والسلسلة المركزية C_3 فقد ظهر بأن كل منp-coumaric acid، shikmic acid، phenylalanine أحسن طلائعتكوين quercetin بنبات الحنطة (Jurd وHorowitz، 1962).

1 .2. 1. الإصطناع الحيوي للشالكون

أثبت الباحث Davis (1955) أن لحمض الشيكميك دورا في تكوين الحلقة البنزينية والسلسلة الكربونية الثلاثية C_6-C_3 بدءا من الجلوكوز. وقد سمح استعمال النظائر الموسومة بـ ^{14}C بتحديد الوسائط الداخلة في هذه الآلية كما يدلي بذلك الشكل (2.C). على حين تتشكل الحلقة (A) من تكاثف ثلاث وحدات من malonyl-CoA (الناجمة عن تثبيت مجموعة كربوكسيل من acetyl-CoA. وهكذا تنحدر النواة الرئيسية للفلافونيدات من تكاثف ثلاث وحدات malonyl-CoA على p-coumaroyl-CoA (Harborne ، 1977)، ويبين الشكل (3.C) بأن الشالكون يتكون إنطلاقا من الـ phenylalanine و الـ coumaryl.



شكل (3.C) : الإصطناع الحيوي للشالكون

شكل (2.C): الإصطناع الحيوي للهيكل الفلافونيدي

1) PAL :Phenylalanine ammonia-lyase ; 2) CHS :Chalcone synthase ; 3)CHI : Chalcone isomerase ; 4) FNSI :Flavone synthase I ; 5) FNSII : Flavone synthase II ; 6) DFR : Dihydroflavonol-4-reductase ; 7) IFS : Isoflavone synthase ; 8) FHT:Flavanone-3-hydroxylase ; 9) ANS : Anthocyanine synthase ; 10)FGT : Flavonoid-3-O-glucosyl-transferase ; 11) FLS : Flavonol synthase

(Horowitzو Jurd، 1962)

1. 2. 2. الإصطناع الحيوي لمختلف هياكل الفلافونيدات بدءا من الشالكون

يعتبر تكوين نواة الشالكون نقطة انطلاق باقي الفلافونيدات الأخرى كما يبديه الشكل (3.C)، ويتم ذلك من البلاستيدات الخضراء. وينتج التنوع الفلافونيدي من التسلسل المثبت على الجـذع الأيضـي المركزي flavanone chalcone ، ويعبر عن كل تسلسل بمواد متراكمة ذات تعقيد بنيوي يتغير بدلالـة الأنزيمات القائمة على تنظيمه، فهناك الأنزيمات المحفزة لتفاعلات التماكـب ، الأكسـدة ، الألكلـة ، الأيسلة ، و تثبيت السكر (Harborne، 1964).

وتوجد خمسة أقسام رئيسية للفلافونيدات متميزة بتنوع كبير سواء من حيث البنية أو من حيث الخواص البيوكيميائية والصيدلانية وهي:

- **Flavanones** : naringenin, citromistin, hesperidin, eriodictyole
- **Flavones** : luteolin, hispidulin, acacetin, apigenin
- **Flavonols** : rhamnetin, morine, myricetin, kaempferol, quercetin, rutin
- **Flavyliums** : pelargonidine, cyanidin, anthocyanidines,
- **Flavanols** أو **Catechins** : afzelecol, theoflavin

كما هو مدون بالجدول (1.C).

وينجم عن هجرة مجموعة الفنيل من الموقع C-2 للحلقة الأساسـية إلـى الموقـع C-3 هيكـل isoflavones. أما بانسبة للهياكل الأخرى التي يقل انتشارها فتتمثل فـي كـل مـن: coumestanes, aurones, chalcones (Mabry وآخرون، 1970). ويكمن الفارق بين مختلف الفلافونيدات في وجـود أو غياب مجموعة الهيدروكسيل (OH) أو مجموعة الميتوكسيل (OCH_3) من العدد والمواقع المختلفة، وفي تثبيت مجموعة *O*-glycoside أو*C*-glycoside ؛ كما يرجع إلى العديد من التوافيق الممكنـة بـين مختلف هذه المستبدلات؛ كما يمكن أن تتواجد الفلافونيدات في صورة أحادية الجزيئة ، بلمرة ثنائية أو عديدة الجزيئـات، وتعـرف الأخيـرة بـ tanins (Jurd وHorowitz ، 1962). وتمثـل الفلافونـات والفلافونولات حوالي 80 % من الفلافونيدات ذات البنية المعروفة . وتتميز جزيئـات flavanones وdihydroflavonols بغياب الرابطة الثنائية بين (C2-C3) ووجود مراكز كيراليـة لتكـون تشـكيلة كربون C°-2 بالنسبة لـ flavanones الطبيعية هـي **2S** ، بينمـا يكـون عـدد المتماكبـات الممكنـة لـ flavanols نظريا هو OH-4. غير أن تشكيل أغلب ما عرف منها هو (3R, 2R) حيث يكون الفنيل والهيدروكسيل في تشكيل مفروق. وتتنوع بنية هذه الأخيرة بنفس طبيعة الفلافونـات والفلافونـولات، غير أن هذ النوع من الفلافونيدات أقل انتشارا مـن مثيلاتهـا غيـر المشـبعة (Harborne وMabry، 1982).

1. 3. المستبدلات

1. 3. 1. تثبيت مجموعة الهيدروكسيل

أكثر الأساليب شيوعا هو تثبيت مجموعات الهيدروكسيل حيث أن 90 % من الفلافونيدات تكـون ثنائية الإستبدال بمجموعتي الهيدروكسيل بالموضعين 5 ،7 بالحلقة A، وهو من نمط تكوين الهيكـل الفلافونيدي. على حين الحلقة B ففي معظم الأحيان تستبدل بمجموعة أكسيجينية فـي الموضـع ´4 . ويقتضي تثبيت عدة هيدروكسيلات بهذه الحلقة مثل هيدروكسيل ´3، ´4، ´5 في حالة الفلافون تـدخل أنزيم hydroxylase. ويتم تثبيت هيدروكسيل الموضع 3 المؤدي إلى الفلافونولات في مرحلة الشالكون ويندر أن تستبدل المواقع ´2 ،´6 (Grise-bach ،1965) شكل (4.C).

kaempferol (b)　　　apigenin (a)

شكل (4.C): تثبيت مجموعة الهيدروكسيل

1. 3. 2. تثبيت مجموعة الميتوكسيل

يتم تثبيت المثيل بعد تثبيت الهيدروكسيل ويتطلب وجود أنـزيم O-methyltransferase (SAH) ومانح للمثيل S-adenosylmethionine (SAM) (شكل a5.C). ويرتبط الجذر الميثيلي بالحلقة البنزينية برابطة C-C كما يظهر بالشكل (b5.C).

Luteolin　SAM　SAH　Chrysocriol

SAM: S-adenosyl methionine
SAH: S-adenosyl homocystéine

(a)

6-C-methyl kaempferol

(b)

شكل (5.C a ، b): تثبيت مجاميع الميتوكسيل

1. 3. 3. تثبيت مجموعات السكريات

إن أغلب السكريات الداخلة بتركيب الإتيروزيدات الفلافونيدية هي ألدوزات إمـا هكسـوزات : D-allose, D-glucose, D-galactose أوبنتـوزات : L-arabinose, D-xylose. ويسـتثنى مـن ذلـك الفركتوز. كما يمكن أن تكون إلى جانب هذه السكريات البسيطة سكريات ثنائية وثلاثية مما يزيد البنية تنوعا. ويتطلب تثبيت السكر مرحلة نهائية في الاصطناع الحيوي وفـي وجـود أنـزيم *O*-glucosyl transferase ومانح للسكر (uridine diphosphateglucose) شكل (6.C).

كما يمكن أن يحدث الارتباط ما بين جزيئة سكرية عند ذرة الكاربون الأنوميري والكـاربون C_6 و / أو C_8 للأجليكون لتكوين رابطة كاربون– كاربون؛ وتقاوم هذه الرابطة الحلمهة الحامضية. ويـنعكس هذا بتنوع يبلغ ذروته عند الفلافونول، وأقل ما يكون بالفلافونات (Harborne، 1967، 1977).

Quercetin

3-glucosyl transférase

UDP-Glu UDP

3-Glucosyl quercetin

a

Schaftoside

b

شكل (6.C a ، b): تثبيت مجموعات السكريات

2. الدراسة الكيميائية للفلافونيدات

1.2 الاستخلاص

يقع تحليل الفلافونيدات غالبا على الأجزاء الهوائية، ويقتضي التجفيف السريع للمادة النباتية عقب القطف مباشرة للتغلب على إمكانية عطب أنزيمات glucosidase، polyphenoloxidase. وهناك العديد من طرق الاستخلاص أكثرها استعمالا الاستخلاص بمحلول كحولي يعامل بعد تركيزه بكمية من الماء المقطر، يستعمل أسيتات الأثيل لاستخلاص الأجليكونات أما البيتانول الخطـي *n*-BuOH فيلجـأ إليـه لاستخلاص الفلافونيدات عديدة السكر(Bronner وBeecher، 1973).

2.2 الفصل والتنقية

إن فصل المركبات الفلافونيدية يعتمد أساسا على الطرق الكروماتوغرافية:

- كروماتوغرافيا العمود
- كروماتوغرافيا التحضيرية على الورق
- كروماتوغرافيا التحضيرية بالطبقة الرقيقة

1.2.2 كروماتوغرافيا العمود

تعتبر كروماتوغرافياالعمود كأول مراحل التنقية، ويعتمد فيها غالبا على متعدد الأميد لقدرته الإدمصاصية العالية وفصلها الجيد وبالإعتماد على تغيير قطبية المذيبات لهجرة العصابات المفصولة بالإستعانة بمصباح UV. ويعود تمليص هذه المركبات الفينولية من العمود إلى:

- كفاءة المذيب لأن يحل محل المركبات الفلافونيدية على الروابط الهيدروجينية.
- كفاءة المذيب في تشكيل روابط أمتن من تلك المشكلة بمتعدد الأميد.

وتتم عملية التمليص باستعمال toluen مع إغنائه بإضافةالميثانول تدريجيا . (Berthier، 1972).

2.2.2 الكروماتوغرافيا التحضيريةعلى الورق

تمثل إحدى الطرق الكلاسيكية المعتمدة في فصل خلائط المركبات القطبية مثل الجليكوزيدات.ويتم الفصل باستعمال ورق Whatman (46 سم × 57 سم) مع أنظمة مائية (Harborne، 1967).وأهم الأنظمة المعتمدة :

1- AcOH حمض الأستيك بتراكيزعدة

2- B.A.W. : الطبقة العضوية *n*-butanol/acetic acid/water [4/1/5]

3- M.A.W. : methanol/acetic acid/water [4/1/5]

4- T.B.A. : tertiobutanol/acetic acid/water [3/1/1]

ومن أهم مزايا هذه الطريقة هي إمكانية الحصول على أكبر كمية من المركبات والتخاص الأقصى من الأحماض الفينولية (Chopin، 1966)

3.2.2 كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

تعتمد كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (ك. ط. ر.) على السليلوزالسيليكاجال أومتعدد الأميد DC6 كطور ثابت. وأهم الأنظمة المستعملة كمماص:

- toluen/methanol/methylethylketone : 4/3/3
- methanol / methylethylketone / petrolium ether/toluen : 7/7/26/60
- water/methanol/methylethylketone/acetylacetone : 13/3/3/1
- methanol /acetic acid/ water : 18/1/1

ومن أهم مزايا هذه التقنية سرعة وحساسية الفصل مع إقتصاد معتبر في كمية المذيبات.

4.2.2 التـنقية بالعمود

لأجل تنقية قصوى للمركبات يستعمل عمود Sephadex LH-20 باستخدام الميثانول كمماص؛ كما يمكن استعمال عمود من متعدد الأميد باستعمال الـ toluen لتراقب هجرة المركبات بالإستعانة بمصباح UV (366 nm).

3.2 التحليل البنيوي

لتحديد بنى المركبات المفصولة تتبع عدة تقنيات:

1.3.2 مطيافية امتصاص أشعة UV

يعتمد مبدأ هذه التقنية على أن كل مركب فلافونيدي ذو طيف مميز بالوسط الميثانولي. ولقد مكنت هذه التقنية من الإيفاء بمعلومات بنيوية وافية ومهمة في تحديد طبيعة ومواضع المستبدلات على الهيكل الفلافونيدي (Mabry وآخرون، 1970).

- **طيف الإمتصاص في الوسط الميثانولي**

تبدي المركبات الفلافونيدية المحتوية على مجموعة كاربونيـل فـي C-4 (flavones وflavonol) عصابتين. تعكس العصابة I المحصورة بين (304-385 nm) إمتصاصـية الكرموفـور cinnamoyl الناتجة من ترافق الحلقة B مع مجموعة الكاربونيل، ويمكن تمييز بنية الفلافونول عن الفلافون بقيمـة δ_{max} لهذه العصابة لأن إضافة الأوكسوكروم OH أو OR في الموضع 3 (flavonol) يسـبب إزاحـة

باتوكرومية لهذه العصابة، ويلخص الشكل (6.C) كافة هذه المعطيات. أما العصـابة II (nm 250-280) فهي تعزى إلى امتصاص كروموفور Benzoyle الناتجة من ترافق الحلقة A مع مجموعة الكاربونيل. وهي تسمح بالتعرف على عدد المستبدلات (Harborne، 1967).

Benzoyl

cinnamoyl

benzoyl/cinnamoyl

شكل(7.C): كروموفوري العصابة I والعصابة II

ويلخص الجدول (2.C) المستويات الإمتصاصية لمختلف الفلافونيدات

جدول (2.C): المستويات الإمتصاصية UV للفلافونيدات (Markham ، 1982).

العصابة II (nm)	العصابة I (nm)	النظام الفلافونيدي
280 – 250	350 – 310	Flavones
280 – 250	360 – 330	Flavonols (3-OR)
280 – 250	385 – 350	Flavonols (3-OH)
275 – 245	330 --310	Isoflavones Isoflavones(5-dehydroxy-6,7ثنائي الأكسجة)
270 – 230 شدة ضعيفة	390 – 340 430 – 380	Chalcones Aurones
280 – 270	560 – 465	Anthocyanidines و Anthocyanes

ويلجأ بعدها إلى سلسة طيفية باستعمال مجموعة من الكواشف كل منها يعضد ويشير إلى بعض الدلالات، ومن ذلك:

- **طيف الإمتصاص في وجود NaOH**

إن الـ NaOH كقاعدة قوية يمكنها أن تؤين كافة الهيدروكسيلات الفلافونيدية خاصـة منهـا OH المواقع '4 و7 و3، وينجم عن هذا فعلا باتوكروميا ويتجلـى أكثـر بالعصـابة I حيـث أن الإنزياح الباتوكرومي مع زيادة الشدة الضوئية يسمح بالتمييز بين فلافونول بـ OH حر في '4 و3

وفلافونول مستبدل في الموضع3؛ ويستعمل هذا الكاشف فوريا وبعد 5 دقائق (Mabry وآخـرون، 1970).

- **طيف الإمتصاص في وجود $AlCl_3$ و$AlCl_3/HCl$**

إن الفعل المخلبي لكلوريد الألومنيوم يمكن أن يتم على مستويين :

- تشكل معقدات غير ثابتة من 2هيدروكسيل حرة بـالموقع (7 ، 6) ortho ، (7 ،8) ، ('3 ، '4).
- تشـكل معقـدات ثابتـة مـع كاربونيـل الموضـع 4 وهيدروكسـيل الموضـع C-3 أو C-5.

يفسر هذا التأثير بإزاحة باتوكرومية للعصابة I، حيث تبقى هذه المعقدات ثابتة بعـد إضـافة HCl شكل (8.C). أما في حالة وجود النمطين المستقر وغير المستقر يبين الطيف إزاحة باتوكروميـة بعـد إضافة$AlCl_3$، ألاّ أن HCl تسبب إزاحة هيبسوكرومية بالنسبة للنمط الأول، ومع ذلك يحتفظ هذا الطيف بإزاحة باتوكرومية للعصابة Iبالنسبة للطيف المسجل بالميثانول (Mabry وآخرون، 1970).

شكل(8.C): بعض أنماط المعقدات الناجمة عن تفاعل كل من $AlCl_3/HCl$ والفلافون والفلافونول.

- **طيف الإمتصاص في وجود أسيتات الصوديوم NaOAc**

تؤين أسيتات الصوديوم الهيدروكسيلات الأكثر حامضية فقط: 'C-4 ، C-3 ،C-7 . ويعتبر NaOAc كاشفا نوعيا لهيدروكسيل الموضع 7 (Mabry وآخرون، 1970).

- **طيف الامتصاص في وجود أسيتات الصوديوم وحمض البوريك ($NaOAc + H_3BO_3$)**

يشكل خليط أسيتات الصوديوم مع حمض البوريك معقدات مخلبية في وجود مجموعة أورثو ثنائي هيدروكسيل باستثناء الموضع C-6-C-5 (Mabry وآخرون، 1970) ويلخص الجدول رقم (3.C) كافة النتائج المتحصل عليها بعد إضافة هذه الكواشف.

جدول (3.C): إزاحات الطيف UV مع إضافة الكواشف (Jurd وHorowitz 1962).

الكاشف	الإزاحة		التعليل
	العصابة I	العصابة II	
MeOH	350 – 310	280 – 250	Flavones
	360 – 330	280 – 250	Flavonols (3-OR)
	385 – 350	280 – 250	Flavonols (3-OH)
NaOMe أو NaOH	استمرار تناقص شدة الإمتصاص بمرور الزمن(تفكك الطيف)		3,4´OH؛ أورثو ثنائي OH على الحلقة A؛ ثلاثة OH متجاورة على الحلقة B
	+45 – 60 مع ثبات شدة الإمتصاص		4´-OH
	+45 – 60 مع نقصان شدة الإمتصاص		4´-OR أو 3-OH
	عصابة جديدة بين 320-335		7-OH
	غياب عصابة بين 320 – 335		7-OR
$AlCl_3/MeOH$	+20 إلى+45		5-OH
	+60		3-OH
$AlCl_3$ +HCl/$AlCl_3$	- 30 إلى -40		أرثو ثنائي OH على الحلقة B
	- 20 إلى -25		أرثو ثنائي OH على الحلقة A (6،7 أو 7،8)
$AlCl_3$ + HCl/MeOH	+ 35 إلى 55		5-OH
	+ 17 إلى 20		5-OH (مع مجموعة اكسجين في C6)
	+ 50 إلى 60		3-OH أو 5-OH مع مجموعة أكسيجينية في C6 أو 5-OH
NaOAc/MeOH		+ 5 إلى 20	7-OH
		إزاحة صغيرة	(6،7)،(7،8) أو 3´ أو 4´ ثنائي OH
	طيف يتفكك بمرور الزمن		Tri OH(7,6,5; 8,7,5; 3,3',4')
NaOAc H_3BO_3	+ 12 إلى 36		3´ ، 4´ ثنائي OH
	+ 5 إلى 10		6 ،7 أو 7، 8 ثنائي OH

ولذا فإن قمم هذه العصابات تحدد طبيعة الفلافونيد وكذا طريقة الأكسجة . وكقاعدة عامة فإن إضافة الهيدروكسيل الحر تحرض الفعل الباتوكرومي. وتحدد الإزاحة الهيبسوكرومية بالنسبة للعصابة

I methylation أو glycosylation المجاميع الهيدروكسيلية 3،5 و4´ . ويمكن للطيـف أن يتـأثر بطبيعة السكر ما عدا في حالة الرامنوز.

2.3.2 ألإستشعاع تحت الضوء UV

هناك علاقة وثيقة بين إستشعاع المركب وطبيعة الاستبدال(Harborne ، 1988) يلخصها الجدول (4.C)

جدول (4.C): العلاقة بين طبيعة الفلافونيد و الإستشعاع تحت UV

لون البقعة الفلافونيدية	نمط الفلافونيد
أسود بنفسجي	فلافون 5،6،7 أو 5،7،8 ثلاثي OH
	فلافونول مستبدل بالموقع3
	بعض الشالكونات
أسود	فلافانون أو فلافانول يملك 3- OH
	فلافون أو فلافانون دون OH بالموقع 5
	فلافونول مستبدل بالموقع 3 بدون OH بالموقع 5
الأصفر	فلافونول مع OH بالموقع 5
أصفر – مخضر	أورون
أصفر- لامع	فلافونول مستبدل بالموقع 5
برتقالي – لامع	أيزوفلافون
أخضر	بعض من الشالكونات
أزرق مخضر	فلافانون بدون OH بالموقع 5

3.3.2 معامل الاحتباس: (R_f)

إنّ قيم R_f تحدد وفقا لما يلي :

$$R_f = \frac{\text{المسافة بين الأصل والبقعة بعد الهجرة}}{\text{المسافة بين الأصل وطليعةالمحلول}}$$

ولقد أمكن الوصول إلى بعض الحقائق إنطلاقا من السلوكيات الكروماتوغرافية والتي يحكمها كل من عامل الحرارة والرطوبة وطبيعةالطور الثابت وطبيعة المحلول و تركيـز العينـة (Loiseleur، 1963). ويلخص الجدول (5.C) العلاقة بين البنى الفلافونيدية وال R_f.

جدول (5.C): العلاقة بين R_f وبنية الفلافونيد (Loiseleur، 1963؛ Ribireau، 1968)

R_f	البنى الفلافونيدية
تناقص R_f بالمحلول العضوي	زيادة عدد المجاميع OH
R_f يتزايد بامحلول العضوي يتناقص بالمحلول المائي	ميثلة OH
تزايد R_f بالمحلول المائي تناقص R_f بالمحلول العضوي	الجلكزة
تزايد R_f بالمحلول العضوي تناقص R_f بالمحلول المائي	الأستلة

من كل ما سبق يمكن الاستخلاص بأن الكواشف تنتج إزاحات تسمح تموضع مختلف مجاميع الهيدروكسيل . كما يمكن أن تنبيء بمستبدلات كل من الفلافون والفلافونول، حيث لا تحدث الإزاحة في حالات الميثلة أو الارتباط بالسكر، وبالتالي يمكن اللجوء إلى تقنيات أخرى بغرض تحديد طبيعة ومواقع الارتباط بالسكر والتحديد النهائي للجزيئة السكرية.

4.3.2 مطيافية الكتلة(SM) بمختلف تقنيات التأين

تعتبر مطيافية الكتلة من أكثر التقنيات تحسسا للفلافونيدات (أقل من 1 مغ) ويلجأ إليها لتأكيد بنية الفلافونيدات بإعطاء المعطيات التالية :

- الصيغة المطلقة للجزيئة
- تحديد طبيعة المستبدلات إنطلاقا من قيمة الأيون الجزيئي.
- توزيع المستبدلات على الحلقة A وB إنطلاقا من تحديد قمم شظايا الجزيئة.
- تحديد مواقع طبيعة الرابطة بين السكرو الأجليكون (C أو O) (Markham، 1982؛ Audier، 1996).

5.3.2 مطيافية الرنين المغناطيسي النووي NMR

تسمح مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ^{1}H NMR وكربون ^{13}C NMR بتحديد البنيات ، أو دراسة فعل الإعاقة للمجاميع المستبدلة.

وتسمح تقنية NMR البروتون بعرفة ما يلي:

- تحديد تموقع بروتونات الجزيئة.
- تحديد نموذج الأكسجة.
- تحديد عدد مواقع مجاميع الميتوكسي.
- تحديد عدد ومواقع وطبيعة السكر.

وتتطلب هذه التقنية كميات أكثر من مطيافية الكتلة وتقنية امتصاص الأشعةUV.

أما تقنية NMR الخاصة ب ^{13}C بأنواعها، وتجاربها ثنائية البعد للبحث عن التعالق بين كل من الكربون والهيدروجين عبر رابطة أو عدة روابط ، فقد استعملت لمختلف أنماط الفلافونيدات الطبيعية، حيث تفي بمعلومات حول الهيكل الكاربوني للجزيئة وذلك من خلال:

- عدد وفضاء الكربون (كل على حدة).
- الروابط السكرية الأجليكونية(-O-) و -C.
- تحديد نقاط الارتباط ما بين وحدات السكر.
- تحديد المستبدلات ومواقع الأستلة .

وأكثر المذيبات استعمالا للفلافونيدات هي : DMSO-d6، $CDCl_3$ ، CD_3OD.

(Harborne وMabry ، 1975)

3. الدراسة الكيميائية لنباتي *C. fuscatum* و*C. vulgaris*

1.3 التعريف بالنباتات المدروسة

1.1.3 نبات *Chrysanthemum fuscatum* Desf.

نبات عشبي ذو أوراق مقسمة إلى خيوط لحمية رفيعة ونورة هامية غير متجانسـة تتكـون مـن نوعين من الأزهار، أزهار أنبوبية صفراء في الوسط تسمى بالأزهار القرصية وهي غير خصبة يكون فيها المبيض عقيما وأخرى شريطية خنثى تقع على المحيط تسمى بالأزهار الشعاعية. تحاط الأزهـار بقلافة تتكون من قنابات حرشفية ذات حافة غشائية عريضة. تستوطن هذه النبتة الأطلس الصـحراوي للجنوب الجزائري والتونسي الممتد حتى منطقة ميزاب وفزان السـبت (Ozenda، 1958 ؛ Quezel وSanta،1963).

يعرف نبات *C. fuscatum* أيضا باسم *Heteromera fuscata* (Quezel و Santa،1963).و يـراد ف الـ *Chrysanthemum* أسمان آخران هما: *Phyrethrum* و *Matricaria* .



شكل (9.C) نبات الأقحوان Desf. ***Chrysanthemum fuscatum***

1.1.1.3 الوضع التقسيمي

المملكة : النباتية	Kingdum : Biota
الشعبة : النباتات الزهرية	Phyllum : Phanerogamae (spermatophyte)
الطائفة: مغطات البذور	Sub Phyllum : Angiospermatophyte
الصف: ذوات الفلقتين	Class : Dicotyledone
تحت صف: النباتات الميتاكلاميدية	S/Class : Metachlamydae
قسم : متحدة البتلات	Serie : Sympetalae
الرتبة: الجرسيات	Order :Companulales
العائلة : المركبة	Family : Compositae
تحت العائلة : الأنبوبية	S/ Family : Tubiflora
الجنس:	Genus : *Chrysanthemum*
النوع :	Species : *fuscatum*

(Ozenda، 1958؛ Quezel و Santa،1963) .

2.1.3 نبات الحنظل *Colocynthis vulgaris*

نبات بري يقتصر وجوده على نوع واحد يعرف بـ *Colocynthis vulgaris shard* . وهو عبارة عن نبات عشبي حولي، سيقانه زاحفة متطاولة وأوراقه كبيرة متبادلـة، راحيـة مفصصـة ، تكسـى الأوراق والسيقان بأوبار، الأزهار وحيدة الجنس تخرج من آباط الأوراق، و الزهرة منتظمة علويـة، الثمرة لاحمة ذات عصير شديد المرارة. تستعمل اوراقه كمدرات بولية ولعلاج اليرقان والربو (Barth وآخرون 2002) بينما تستعمل الأوراق ضد إلتهابات الثدي والام الرحم والروماتيزم ، ويستعمل اللب كطارد حشري ومضاد للسرطان، يؤدي تناوله المفرط إلىحالة تسمم حاد (Adam وآخرون، 2001) .

1.2.1.3 الوضع التقسيمي لنبات الحنظل

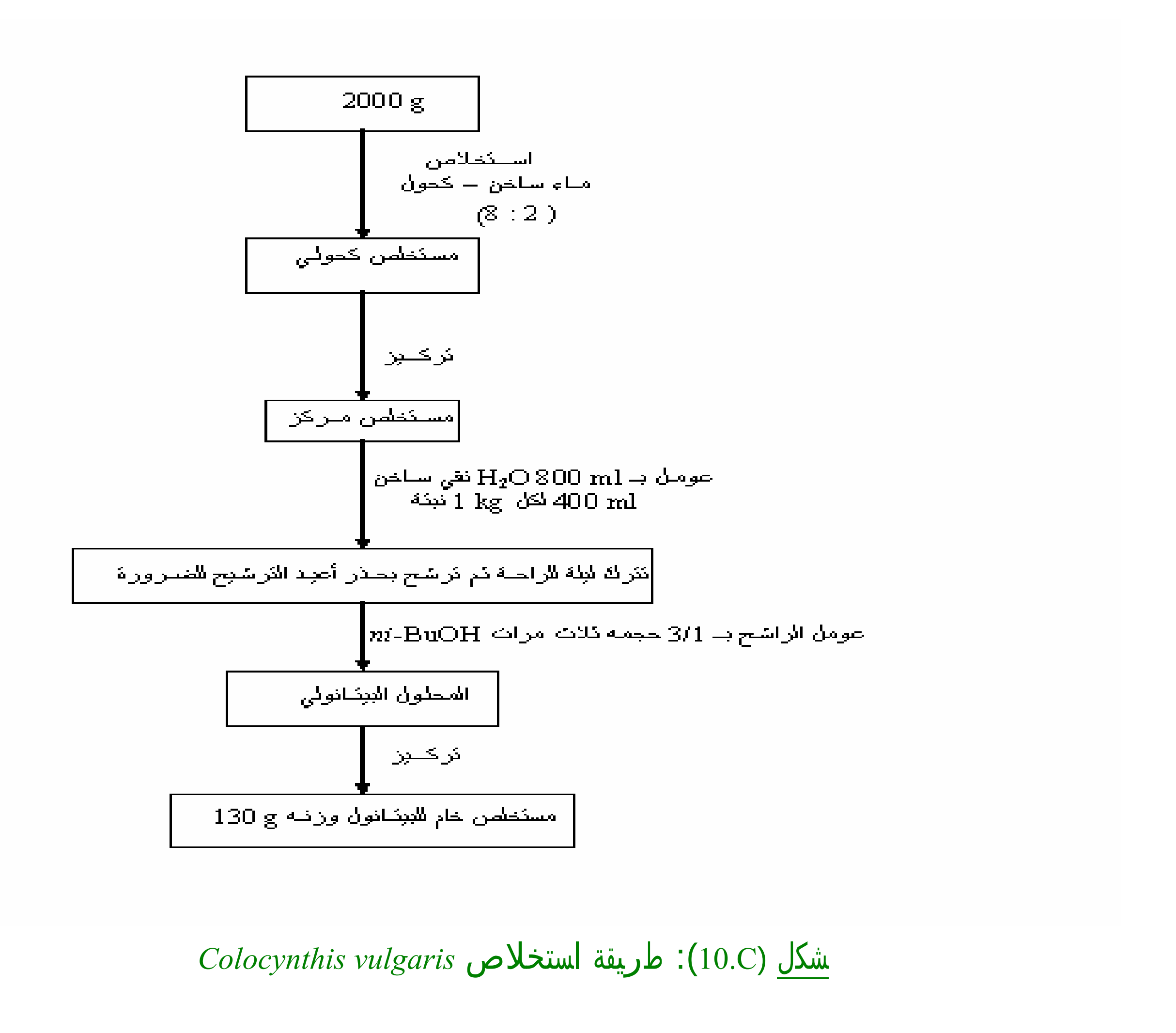
المملكة : النباتية	Kingdum : Biota
الشعبة : النباتات الزهرية	Phyllum : Phanerogamae (spermatophyte)
الطائفة: مغطات البذور	Sub Phyllum : Angiospermatophyte
الصف: ذوات الفلقتين	Class : Dicotyledone
الرتبة: القـرعيات	Order :Curcubitales
العائلة : القرعية	Family : Curcubitaceae
الجنس:	Genus : *Colocynthis*
النوع :	Species : *vulgaris*

(Ozenda، 1958؛ Quezel و Santa،1963)

2.3 تحضير المستخلص النباتي

1.2.3 نبات الحنظل *Colocynthis vulgaris*

تم جلب نبات الحنظل من منطقة القرارة قرب مدينة توقورت سنة 1997 شهر أفريل، وبلغت الكتلة الجافة للنبتة g 1750 نقعت بالماء والميثانول 80/20 (v/v) و ألحقت بنقع ثـان وثالـث بالميثـانول 100 %، أضيف إلى المستخلص الكحولي 1200 ml من الماء المقطرعند درجة الغليان ثم يترك ليلـة كاملة للراحة ويرشح ثم يتخاص بطريقة (سائل-سائل) بالمـذيبات: كلوروفـورم، خـلات الإثيـل و البيتانول.تجفف الأطوار العضوية بـ Na_2SO_4 وتركز لتكون كتلة المستخلص البيتانولي 149.7 g.

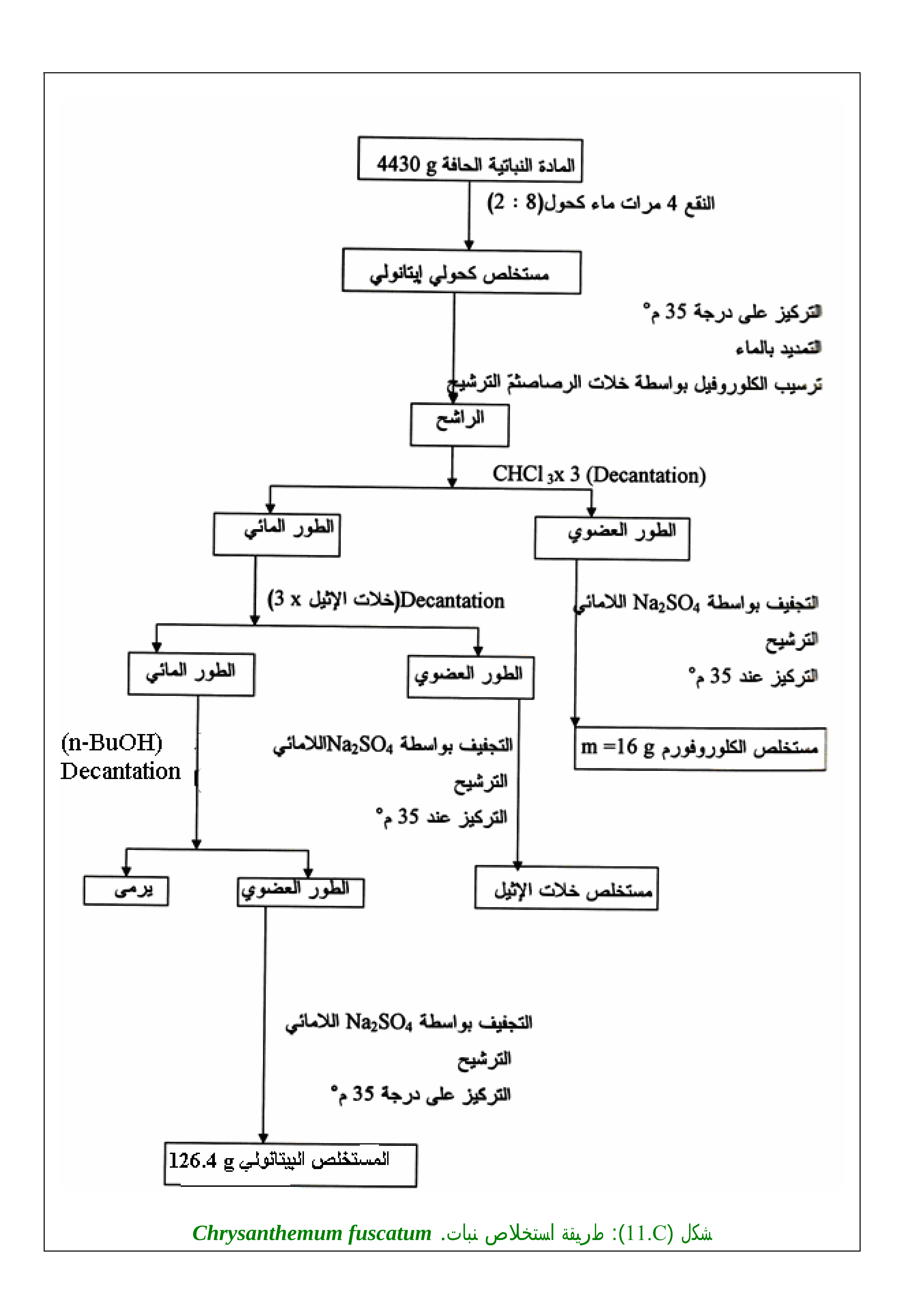


شكل (10.C): طريقة استخلاص *Colocynthis vulgaris*

2.2.3 نبات *Chrysanthemum fuscatum* Desf.

تم قطف الأجزاء الهوائية لنبات *C. fuscatum* الذي ينبت بريا بالصحراء من ضايات مدينة توقرت بسنة 1997 وقد تم تصنيفها بمساعدة الأستاذة الدكتورة خاف ا بقسم علوم الطبيعة والحياة ، تم تجفيف المادة تحت الظل في مكان جيد التهوية

بعد سحق الأجزاء النباتية الجافة (4430 g) تم نقعها مع خليط الميثانول / الماء (2 : 8 v/v)؛ وركّز هذا المستخلص تحت ضغط منخفض أضيف إليه كمية من الماء المقطر عند درجة الغليان (400 ml/Kg). وبعد الترشيح تم استخلاصها تتابعيا بمذيبات الكلوروفورم، خلات الاثيل ($CH_3COOC_2H_5$) والبيتانول (*n*-BuOH) (3 x 150 ml). جمعت وجففت الأطوار العضوية بـ Na_2SO_4ثم ركزت جيدا تحت الضغط المنخفض وأدت إلى مستخلصات الكلوروفورم، أسيتات الإثيل و*n*-BuOH (126.4 g) الذي يعتبر مستخلصا واعدا بالفلافونيدات الجليكوزيدية ومتعددات الهيدروكسيل.



شكل (11.C): طريقة استخلاص نبات. ***Chrysanthemum fuscatum***

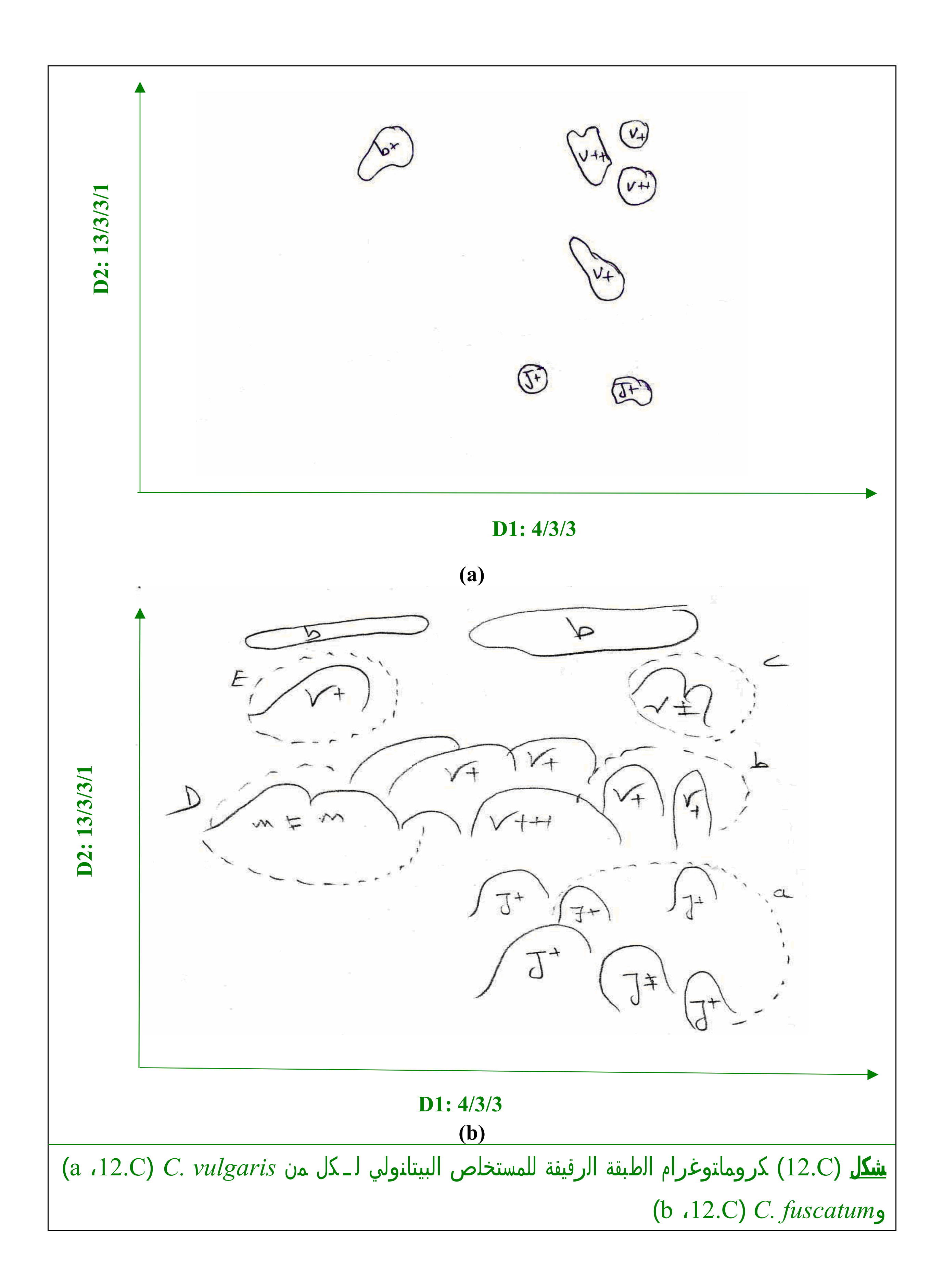
3.3 طرق الفصل

1.3.3 الفحص الكروموتوغرافي

قبل الشروع في عملية الفصل أجرينا فحوصا تحليلية تمهيديـة للمسـتخاص البيتـانولي لنبـاتي *C. fuscatum* و *C. vulgaris* لتحديد مدى غنى النبتة بالمكونات الفلافونيدية ولمعرفـة طبيعـة هـذه المركبات وذلك باستعمال كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة (ك.ط.ر) بمتعدد الأميد DC-6.6 باستعمال الأنظمة التالية

- البعد الأول(D1) : toluen/methanol/methylethylketone : 3/3/ 4
- البعد الثاني (D2) : water/methanol/methylethylketone/acetylacetone :13/3/3/1

ويلخص الشكل (12.C، a) معطيات الخريطة الفلافونيدية للمستخلص البيتانولي *C. fuscatum* و*C. vulgaris* (12.C، b)، كما تدون هذه المعطيات الجدول (6.C).



شكل (12.C) كروماتوغرام الطبقة الرقيقة للمستخلص البيتانولي لـكل من *C. vulgaris* (12.C، a) و*C. fuscatum* (12.C، b)

جدول (6.C) : معطيات الخريطة الفلافونيدية لـ *C. fuscatum*

الإستشعاع	الهيكلة المحتملة
بنفسجي مسود	فلافون، فلافون (5-OH) فلافون (8-OH , 6-OH) b : أحادي أو ثنائي جليكوزيد = عديد الهيدروكسيل c : عديد الجليكوزيد ويحتوي ميتوكسيل D : أحادية الهيدروكسيل E : عديد الجليكوزيد وعديد الهيدروكسيل
الأزرق	أحماض فينولية
الأصفر	فلافونول (3-OH مع أو دون 5-OH) a : أجليكون
بني	أحادي الجليكوزيد وعديد الميتوكسيل أو أجليكون
ملاحظات	+ + + كثيف التركيز + + متوسط التركيز + طفيف التركيز

يتضح من معاينة الجمل الكروماتوغرافية السابقة غنى *C. fuscatum* بالمركبات الفلافونيدية حسب كروماتوغرام ثنائي البعد لطور البيتانول (جدول 6.C) .

2.3.3 كروماتوغرافيا العمود

ولفصل أكبر كمية ممكنة من الفلافونيدات ارتأينا اجراء فصل أولي بكروماتوغرافيا العمود لـ 12.5 g من المستخلص البيتانولي. وقد اخترنا لهذا الغرض طورا من متعدد الأميد SC 6 (polycaprolactame) حيث تعتبر مساحيق هذا الأخير التطبيق الأمثل لكروماتوغرافيا العمود في فصل الفلافونيدات نظرا للقدرة الادمصاصية العالية. وتمت عملية التمليص باستعمال toluen مع اغنائه بالميثانول تدريجيا والمتابعة بالـ UV حيث λ =365 nm وبعد معاينة الكسور المحصل عليها باستعمال كروموغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية من متعدد الأميد DC 6.6 بالجمل :

- toluen/methanol/methylethylketone : 4/3/3
- water/methanol/methylethylketone/acetylacetone : 13/3/3/1
- methanol / AcOH /water : 18/1/1

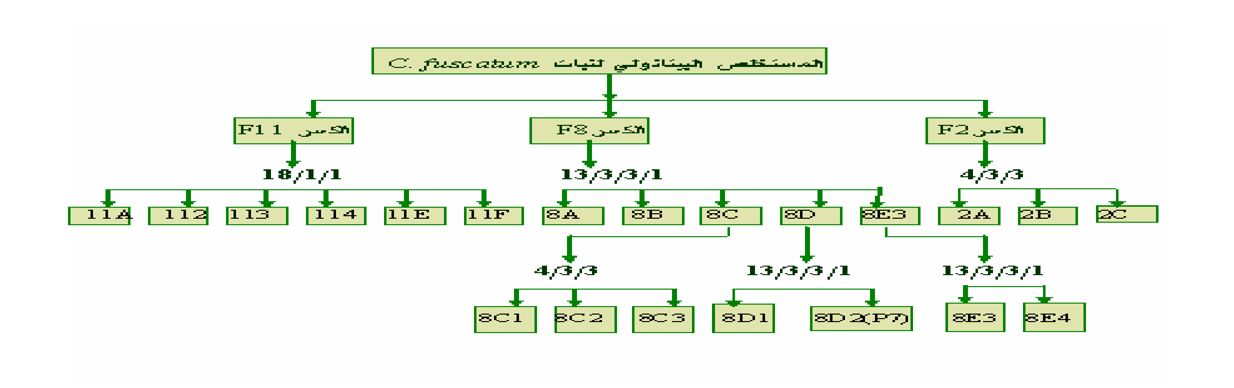
تم تجميع نتائج تتابع تمليص العمود في الجدول (7.C)

جدول (7.C) الكسور الناتجة من تمليص العمود الكروموتغرافي لنبات *C. fuscatum*

رقم الكسر	toluen %	MeOH %	ملاحظات
1	100	0	لا أثر لمركبات فلافونيدية
2	96	4	خليط
3	90	10	خليط
4	85	15	معقد
5	80	20	معقد
6	75	25	معقد
7	65	35	معقد
8	65	35	خليط
9	55	45	خليط
10	55	45	خليط
11	20	80	خليط
12	0	100	خليط

وكما هو معروف في فصل الفلافونيدات فإننا لا نحصل عادة من خلال العمـود الأولـي علـى مركبات نقية بل خلائط أقل تعقيدا، وبالنسبة لهذا العمل فإن الكسور الأقل تعقيدا وذات الأهمية المعتبرة من حيث الوزن قد استقطبت اهتمامنا إذ تم انتقاء الكسور 2، 8، 11 والتي مررت بسلسلة من عمليات الفصل باستعمال (ك.ط.ر) التحضيرية من متعدد DC 6.6 اعتمادا على أنظمة مختلفة تتبـع أحيانـا بالتنقية على عمود الـ 20 Sephadex LH بإستعمال الميثانول كطور متحرك .

ويمكن توضيح سلسلة عمليات الفصل المتعاقبة في الشكل (13.C).



شكل (13.C) سلسلة عمليات الفصل

3.3.3 كروماتوغرافيا التحليلية على الطبقة الرقيقة

لقد تم فحص الكسور المتحصل عليها لكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة على الأنظمة 13/3/3/1 و 4/3/3 و 18/1/1 .

- دراسة الكسر F2

تمت دراسة هذا الكسر اعتمادا على النظام D_1 (4/3/3) على متعدد الأميد DC 6.6 للوصول إلى ثلاث مركبات و هي :

2A، 2B، 2C.

- دراسة الكسرF8

إن دراسة هذا الكسر بالنظام D_2 (13/3/3/1) بواسطة متعدد الأميد أدى إلى 5 تحـت كسـور: 8A، 8B، 8C، 8D، 8E. وقد مكن تحت الكسـر 8C مـن الوصـول إلـى المركبـات: 8C1،8C2، 8C3 بالنظامD1، ومكن تحت الكسر 8D من الوصول الى المركبين 8D1، 8D2 (P7) اعتمادا على النظـام D2 ، بينما أعطى تحت الكسر 8E المركبين 8E3، 8E4 بالنظامD2. وهكذا بعد التنقية مكن الكسـرF8 من الوصول إلى 7مركبات.

- دراسة الكسرF11

إن الدراسة التحليلية على الكسر F 11 مكنت من الوصول إلى 6 مركبات باستعمال نظامD3: 18/1/1 إلى 11A، 112، 113، 114، 11E، 11F. تم الاعتماد في التعريف على البنى الكيماوية للمركبات على أساس السلوك الكروماتوغرافي ومطيافية الأشعة UV ومطيافية ^{1}H NMR و^{13}C NMR وأحيانا استدعى تدخل مطيافية الكتلة.

مكنت عملية الاستخلاص ومختلف طرق الفصل من الوصول الى 17 مركبا . والملفت للنظر أن بعض المركبات رغم النقاوة التي أبدتها في السلوك الكروماتوغرافي فإنها استدعت تدخل عمود الـ sefadex للحصول على مركبات نقية جدا مكنت من إعطاء الصيغة النهائيـة للمركبـات (8C2 ، 8C3 ، 8D2).

كما اعتبرت المركبات 8C2، 8C3 ،8d2، 114 ، 11E ذات كمية تـفي بالتحاليـل اللازمـة لتحديـد البنى.

وينبغي الإشارة إلى أن 5 من المركبات قد ضاعت خلال تمريره علـى عمـود الـ ـ Sephadex LH20. وأخضعت 7مركبات للتحليل الجزيئي، وقد أجريت الإختبارات البيولوجية لبعض المركبـات قبل التحديد البنيوي. كما تم الإستعانة بالكسور 9، 10، 12 بغرض ولازالات قيد الدراسة.

4.3 التحديد البنيوي

أدلت التجارب الأولى التي تم على أساسها الوصول إلى 5 مركبات (8C2، 8C3، 8D2 ، 114 ، 11E) والتي اعتبرت كافية للتحليل البنيوي، وقد أخضعت كافة هذه الدراسات لما يلي :

- اللون الاشتعاعي .
- المعطيات المطيافية لـ NMR .
- السلسلة المطيافية UV .
- الكتلة.
- الحلمهة الحامضية .

1.4.3 التعيين البنيوي للمركب 8C2

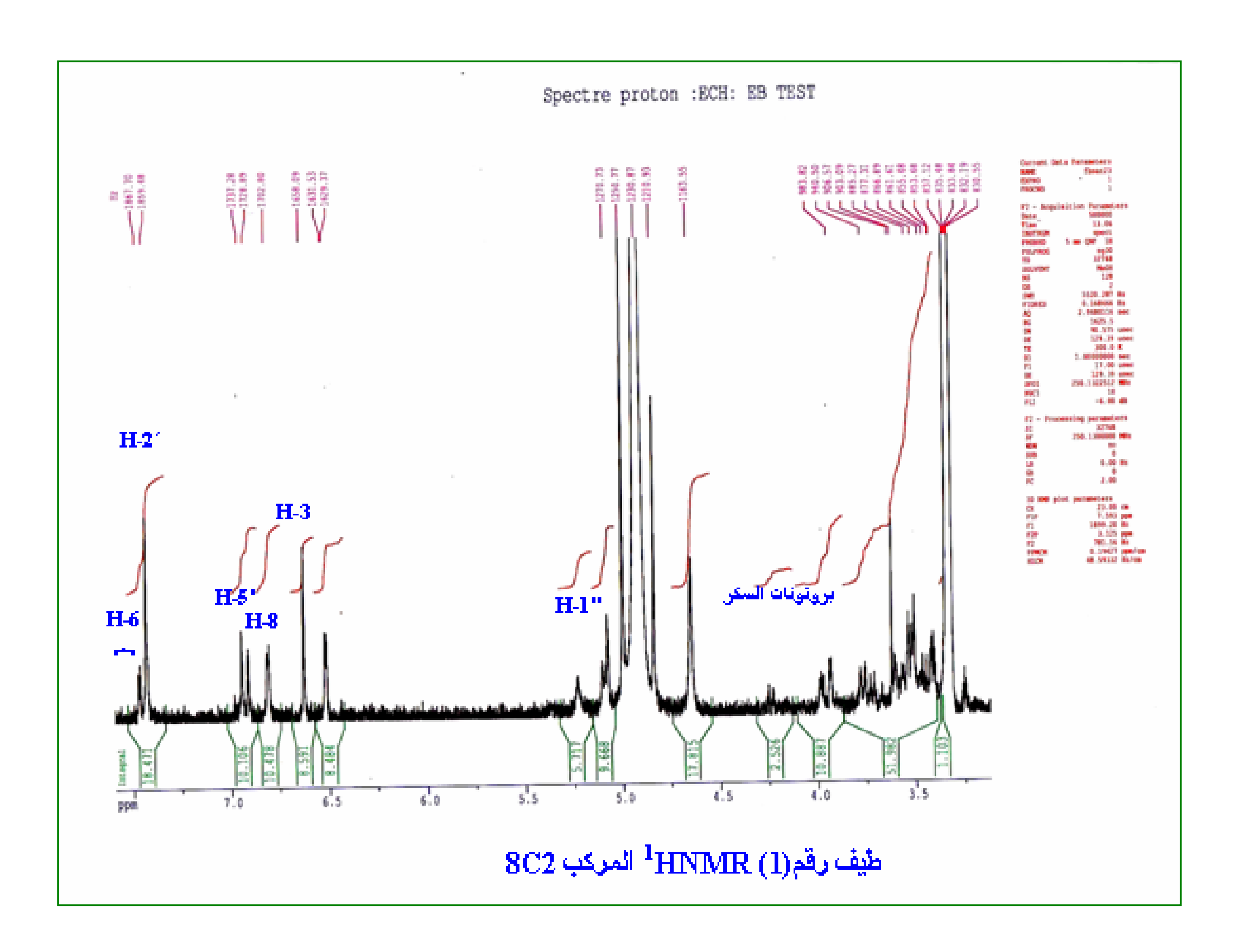
1.1.4.3 المعطيات المطيافية

جدول (8.C): مطيافية الرنين المغناطيسي النووي لبروتون ^{1}H NMR (250 *MHz*، CD_3OD) (طيف رقم 1 ، طيف رقم'1، طيف رقم "1).

إزاحة كميائية (δ ppm)	التعددية	ثابت التزاوج (*J*, Hz)	التكامل	التوزيع
7.42	أحادي عريض		1H	H-2'
7.40	ثنائي ثنائي	9.4 -2.2	1H	H-6'
6.93	ثنائي	9.4	1H	H-5'
6.81	ثنائي	2.2	1H	H-8
6.63	أحادي		1H	H-3
6.52	ثنائي	2.2	1H	H-6
5.10	ثنائي	10	1H	H-1" (سكر)
4.25 -3.25	متعدد		6H	6H (بروتونات أخرى للسكر)

جدول (9.C): مطيافية امتصاص الأشعة الفوق البنفسجية-المرئية (طيف رقم 2).

الكواشف	الطول الموجي nm		
	عصابة II	نتوءات أخرى	عصابة I
MeOH	267		336
NaOH	275		405
$AlCl_3$	275	330 - 291	423
HCl /$AlCl_3$	275	355 - 296	385
NaOAc	267		400
H_3BO3 / NaOAc	260		370
NaOH	مستـقر بعد 5 دقائق		



طيف رقم (1) ^{1}HNMR المركب 8C2

Spectre proton :ECH: EB TEST

H-2´
H-6´
H-5´
H-8
H-3
H-6

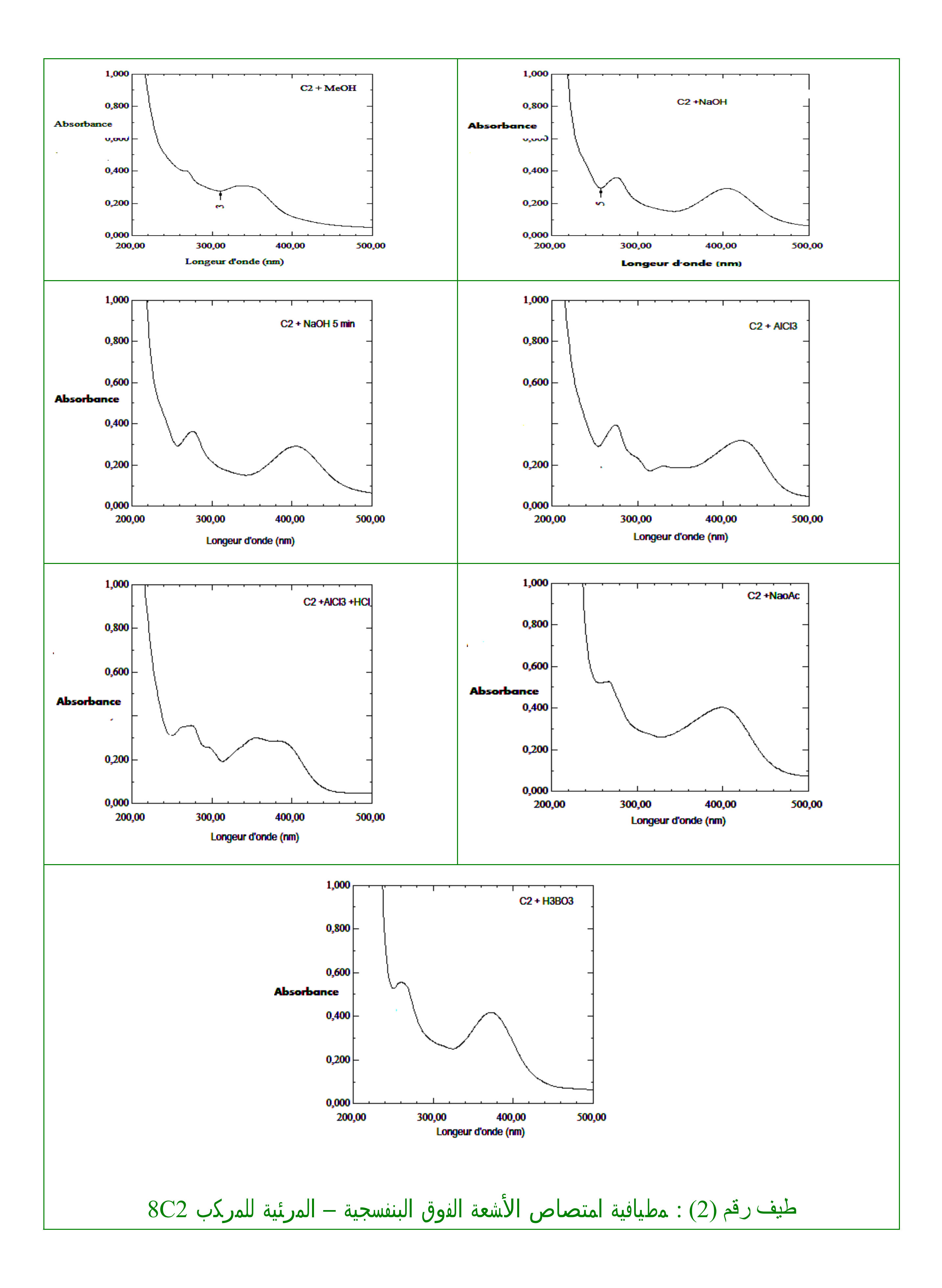
ppm 7.25 7.00 6.75 6.50

طيف رقم (1´) ^{1}HNMR المركب 8C2

Spectre proton :ECH: EB TEST

ppm 5.00 4.75 4.50 4.25 4.00 3.75 3.50 3.25

طيف رقم (1´´) ^{1}HNMR المركب 8C2



طيف رقم (2) : مطيافية امتصاص الأشعة الفوق البنفسجية – المرئية للمركب 8C2

التعليل :

من خلال فحص طيف ^{1}H NMR (طيف رقم1، '1، "1) للمركب تظهر إشارات في المجال العطري مميزة لبنية فلافونيدية ، حيث تبدو الحلقة B ثلاثية الاستبدال وبهذا يبين هذا الطيف ثنائي ثنائي عند (δ = 7.4 ppm, 1H , J = 9.4 , 2.2 Hz) تلحق بـ H-6' مغطى جزئيا بأحادي عريض عند (δ =7.42 ppm) تلحق بـ H-2´ إلى جانب ثنائي آخر عند(δ = 6.93 ppm, 1H, J = 9.4 Hz) يمكن الحاقه بـ H-5´ . كما يظهر الطيف أيضا وجود ثلاث اشارات أخرى ، إحداها عند δ = 6.63 ppm تخص H-3 المميزة للفلافون. أما الباقيتان فتمثلان ثنائيتين إحداها عند δ = 6.81 ppm (1H , J = 2.2 Hz) والثانية عند δ = 6.52 ppm (1H , J = 2.2 Hz) يلحقان على التوالي بكل من H-8 ، H-6. إلى جانب هذه الإشارات العطرية تظهر إشارات أخرى في مجال الحقول الكبرى تنسب لمستبدل سكري الذي يمكن أن يكون سكرالجلوكوز لوجود ثنائية عند δ = 5.10 ppm (J= 10 Hz) تلحق بالبروتون الأنوميري للسكر؛ بينما تظهر باقي إشارات السكر في المجال(3.25-4.25 ppm). ومن خلال هذه المعطيات يتبين أن المركب عبارة عن فلافون حلقته B ثنائية الاستبدال، أي أنه لهيكل luteolin أحد هيدروكسيلاته مستبدل بسكر جلوكوز. وبالرجوع إلى اللون الاسشتعاعي البنفسجي تحت ضوء Wood وكذا طيف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية المسجل بالميثانول (طيف رقم 2) الذي يبين العصابة I عند λ_{max} = 336 nm يدلان على كون المركب ذو هيكل فلافون. بمقارنة الطيف بعد اضافة NaOH مع طيف MeOH نجد أن العصابة I تعرضت لإزاحة باتوكرومية $\Delta\lambda$ = 69 nm مع زيادة في الشدة الضوئية مما يدل على وجود OH حر بالموقع 4´ . كما يلاحظ عدم ظهور عصابة جديدة في المجال(320-335nm) مشيرا إلى عدم وجود OH حر بالموقع C-7. وأما باجراء مقارنة بين الطيف بعد إضافة $AlCl_3$ وطيف MeOH فإننا نجد أن هناك إزاحة باتوكرومية للعصابة I ($\Delta\lambda$ = 87 nm). وبإضافة HCl إلى نفس العينة نجد أن هناك إزاحة هيبسوكرومية عند مقارنة طيف ($AlCl_3$ + HCl) بـ $AlCl_3$ ($\Delta\lambda$ =-38 nm) مما يدل على كون المركب يتمتع بنظام أرثو ثنائي في هيدروكسيل على الحلقة B أي 3´, 4´ dihydroxy. وأما بمقارنة طيف ($AlCl_3$ + HCl) بطيف MeOH فتظهر إزاحة باتوكرومية للعصابة I مقدارها 49 nm تدل على وجود مجموعة OH حرعند الموقع C-5 وعدم وجود مجموعة أكسيجينية في الموقع 6. وعند مقارنة الطيف المشبع بـ NaOAc بطيف MeOH لم تسجل أي إزاحة بالعصابة II . ومن خلال مجموع هذه المعطيات الطيفية يظهر أن السكر لن يتوضع إلاّ على الموقع7. أما طبيعة السكر فقد تم تأكيدها بالحلمهة الحامضية التي سمحت بفصل السكر من الأجليكون والتأكد من طبيعته باستعمال الكروماتوغرافيا وبالاستعانة بعينات شاهدة. وقد بينت هذه التقنية أن السكر عبارة عن جلوكوز انطلاقا من مقارنة R_f سكر هذا المركب مع R_f الشاهد؛ بالتالي تكون صيغة المركب المقترحة هي كالتالي :

كل المعطيات المطيافية مدونة بالجدول (C.8 ، C.9).

2.4.3 تعيين بنية المركب 8C3

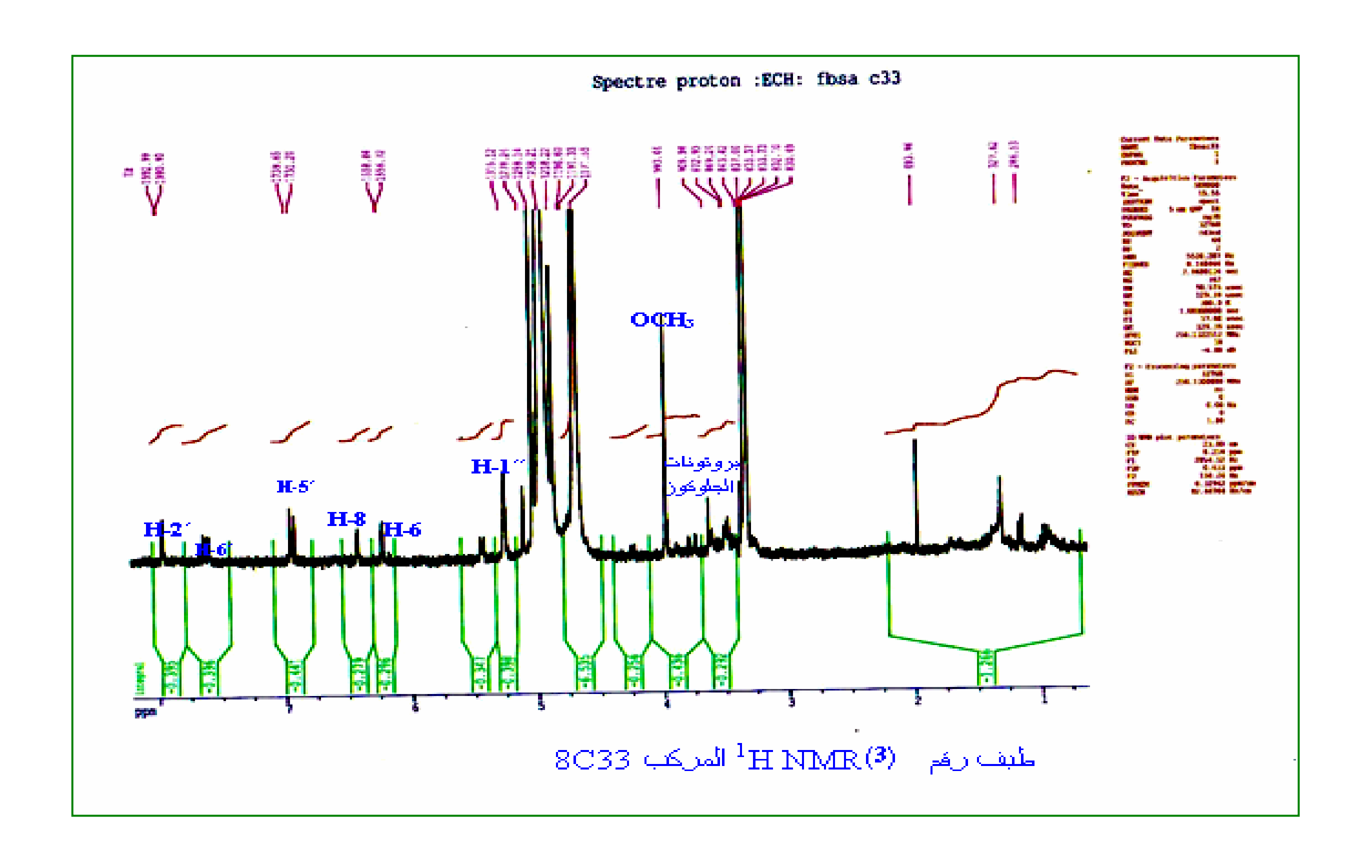
1.2.4.3 المعطيات المطيافية

جدول (10.C): مطيافية الرنين المغناطيسي النووي لبروتون ^{1}H NMR (250 *MHz*، CD_3OD) (طيف رقم 3 ، طيف رقم ´3).

إزاحة كميائية (δ ppm)	التعددية	ثابت التزاوج (J, Hz)	التكامل	التوزيع
7.96	ثنائي	2.1	1H	H-2´
7.61	ثنائي ثنائي	2.1 ، 8.4	1H	H-6´
6.94	ثنائي	8.4	1H	H-5´
6.42	ثنائي	2.1	1H	H-8
6.23	ثنائي	2.1	1H	H-6
5.43	ثنائي	8.3	1H	H-1˝ (جلوكوز)
4.25-3.25	متعدد		6H	بروتونات الجلوكوز
3.97	أحادي		3H	$O\text{-}CH_3$

جدول (11.C): مطيافية امتصاص الأشعة فوق البنفسجيةالمرئية – (طيف رقم 4).

الكواشف	الطول الموجي nm		
	عصابة II	نتوءات أخرى	عصابة I
MeOH	268		351
NaOH	274	319	410
$AlCl_3$	269	299	405
$HCl/AlCl_3$	269	299	403
NaOAc	274	309	387
H_3BO_3/NaOAc	270	312	366
NaOH	مستقـر بعد 5 دقائق		



طيف رقم (3) ^{1}H NMR المركب 8C33

Spectre proton :ECH: fbsa c33

H-2'

H-6'

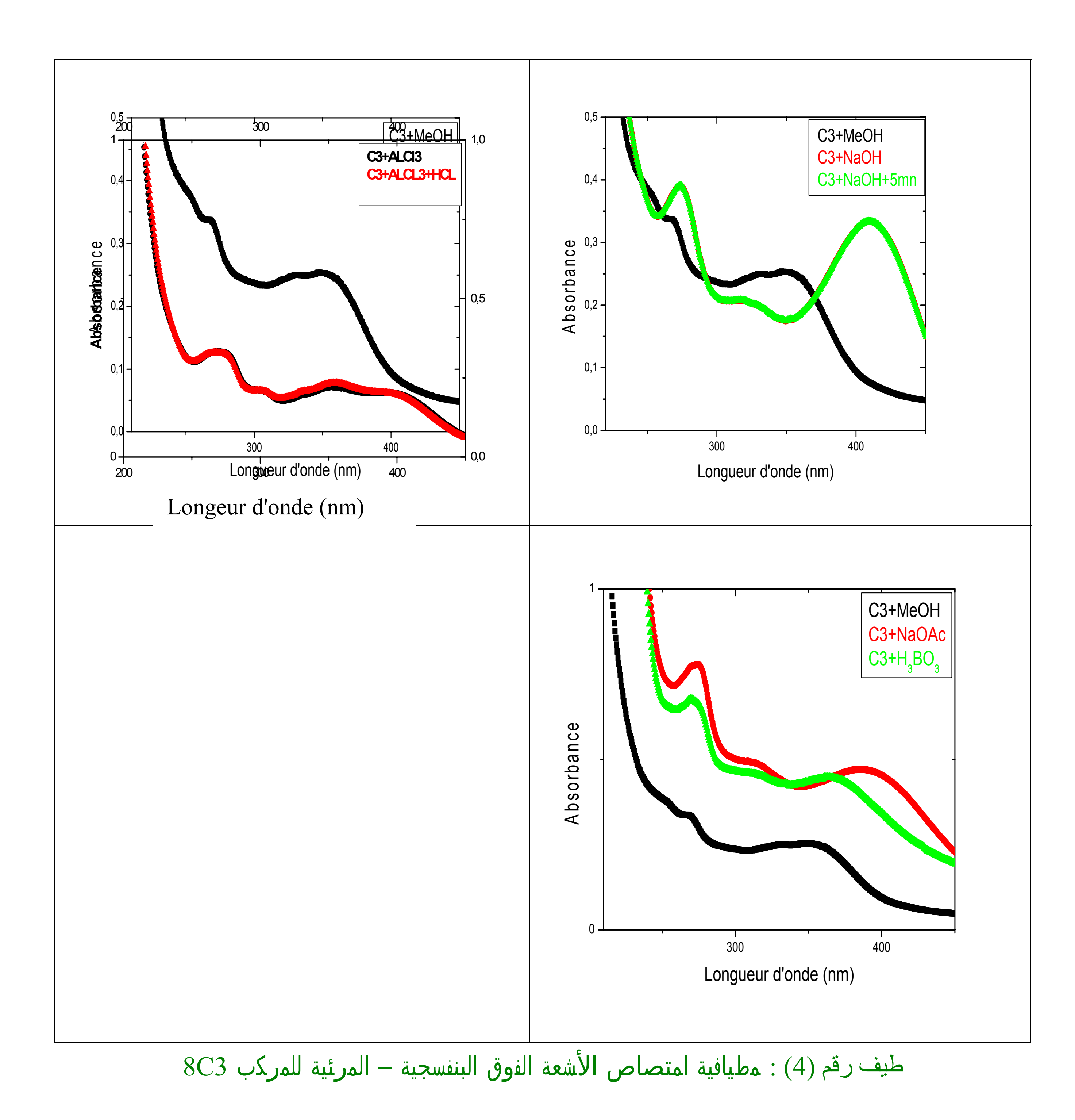
H-5'

H-8

H-6

ppm 7.75 7.50 7.25 7.00 6.75 6.50 6.25

طيف رقم (3') ^{1}H NMR المركب 8C3



طيف رقم (4) : مطيافية امتصاص الأشعة الفوق البنفسجية – المرئية للمركب 8C3

التعليل

يبين فحص طيف ^{1}H NMR (طيف رقم 3، ´3) وجـود إشـارات فـي المنطقـة الخاصـة بالبروتونات العطرية ، مما يوحي بوجود مركب من عائلة الفلافونيدات. وبالمعاينة الجيدة يتضح أيضا أن الحلقة B ثنائية الاستبدال، ويدل على ذلك وجود إشارة ثنائي– ثنائي (1H, J = 8.4, 2.1 Hz) عنـد δ =7.61 ppm يلحق بالبروتون ´H-6. أما الإشارة الثنائية (1H, J = 2.1 Hz) عنـد ppm δ =7.96 فيمكن إلحاقها بالبروتون ´H-2. في حين الإشارة الثالثة وفي نفـس المجـال والمتمثلـة فـي ثنـائي (1H, J = 8.4 Hz) عند δ = 6.94 ppm فتلحق بالبروتون ´H-5 . وتظهر إلى جانب ذلك وفي المجال العطري إشارتان لثنائيتين (J = 2.1 Hz) بتكامل 1H لكل منهماعنـد δ = 6.23 ppm و δ = 6.42 ppm تلحقان بكل من: H-6 وH-8 على التوالي. كما تظهر في مجال الحقول الأكبر عدة إشارات منها إشارة لثنائي (1H, J = 8.3 Hz) عند δ = 5.43 ppm خاصة ببروتون أنوميري لسكر الجلوكوز. كما تظهـر إشـارة أحاديـة لـثلاث بروتونـات عنـد 3.97 ppm = δ تلحـق بمجموعـة ميتوكسـيل. ويتبين من خلال هذه المعطيات أن المركب عبارة عن هيكل لكرستين بمجموعتين مستبدلتين إحـداهما سكر والثانية مجموعة ميتوكسيل. وبالرجوع إلى معطيات طيف امتصاص الأشـعة فـوق البنفسـجية وانطلاقا من اللون الإستشعاعي البنفسجي (طيف رقم4) يكون الموقع 3 عبارة عـن (H) فلافـون أو (OR) فلافونول مستبدل . ويبدي الطيف المسجل في الميثـانول العصـابة I عنـد λ_{max} = 351 nm فنستنتج أن المركب فلافونول مستبدل عند الموقع 3 (3-OR).

وبمقارنة الطيف بعد اضافة الـ NaOH نجد أن العصابة I تعرضت لإزاحـة باتوكروميـة مقـدارها 59 nm إضافة إلى زيادة في الشدة الضوئية مما يستدل على ذلك بوجود OH حـر فـي الموقـع'4. ويستدل بظهور قمة جديدة بطيف NaOH عند λ_{max} = 319 nm على كون الموقع 7 حامل لـOH حر. ومن خلال إجراء مقارنة للعصابة بين الطيفين بعد إضافة $AlCl_3$ و$AlCl_3$ + HCl يتبين غيـاب نظـام أرثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة B. كما يتبين إحتواء المركب على OH حر في الموقع5 وذلك من خلال ظهور الإزاحة الباتوكرومية للعصابة I ($\Delta\lambda$ = 52 nm) من خلال المقارنة المجراة بين طيـف $AlCl_3$ + HCl وطيف الميثانول .

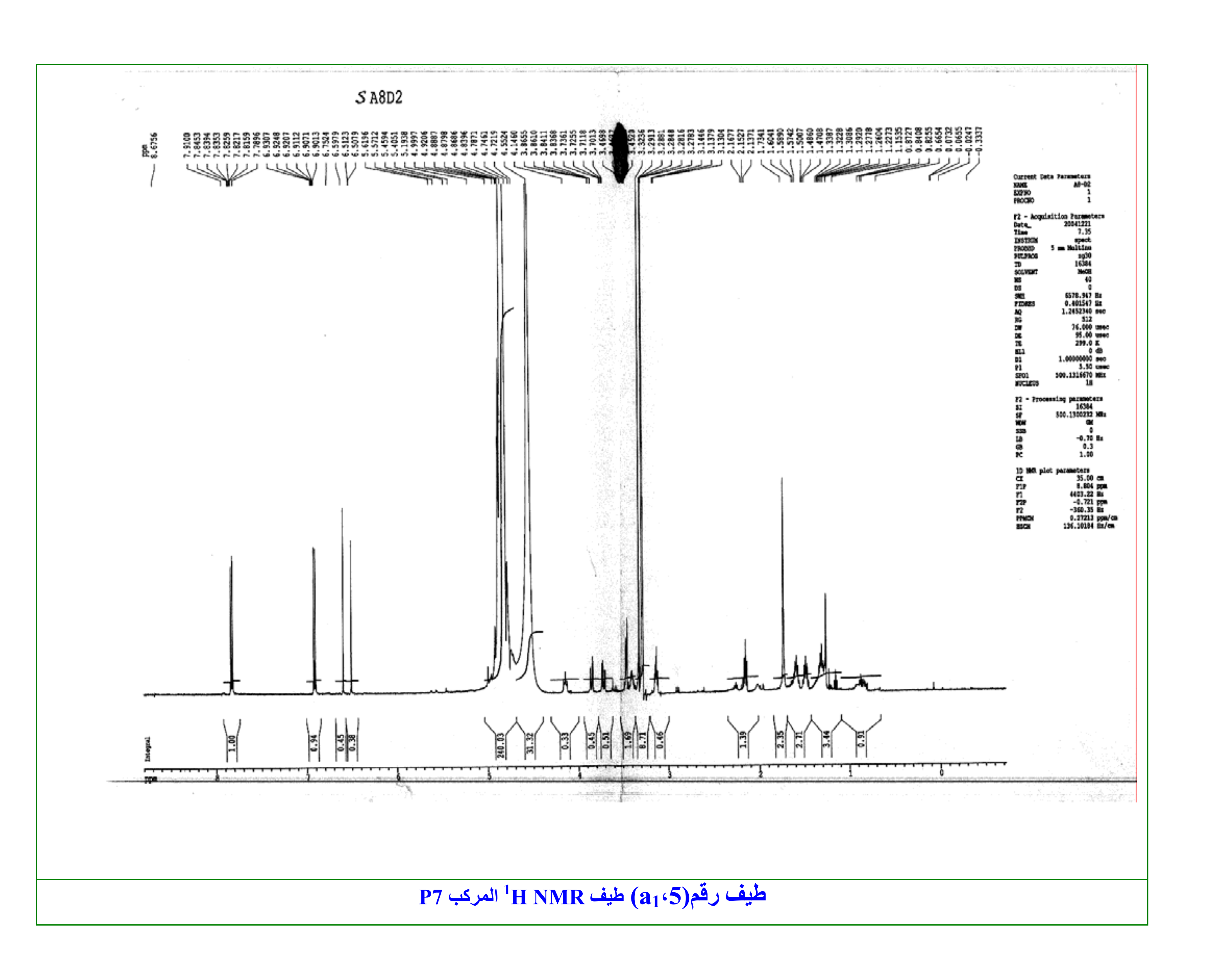
ومن مجموع هذه المعطيات الطيفية يتبين أن المركب عبارة عن فلافونيـد بهيكـل الكرسـيتين مستبدل في الموقعين 3 ، '3 بمجموعتي ميتوكسيل وسكر. وللفصل في تموضـع هـذين المسـتبدلين والتعرف في ذات الوقت على طبيعة السكر قمنا بإجراء حلمهة حامضية وفي وجود الجلوكوز كشـاهد سمحت بفصل الأجليكون الميتوكسيلي والسكر بواسطة استخلاص (سائل ، سائل) باسـتعمال الإثـر الاثيلي. أعطى الطور العضوي بعد تركيزه أجليكون ذي لون إستشعاعي مصفر مما يـدل علـى ان

المركب فلافونول ، ويكون هذا كاف لتموضع السكر بـ C-3 ، وتـدون كافـة المعطيـات الطيفيـة بالجداول (10.C و 11.C). يمكن ادراج الصيغة كما يلي :

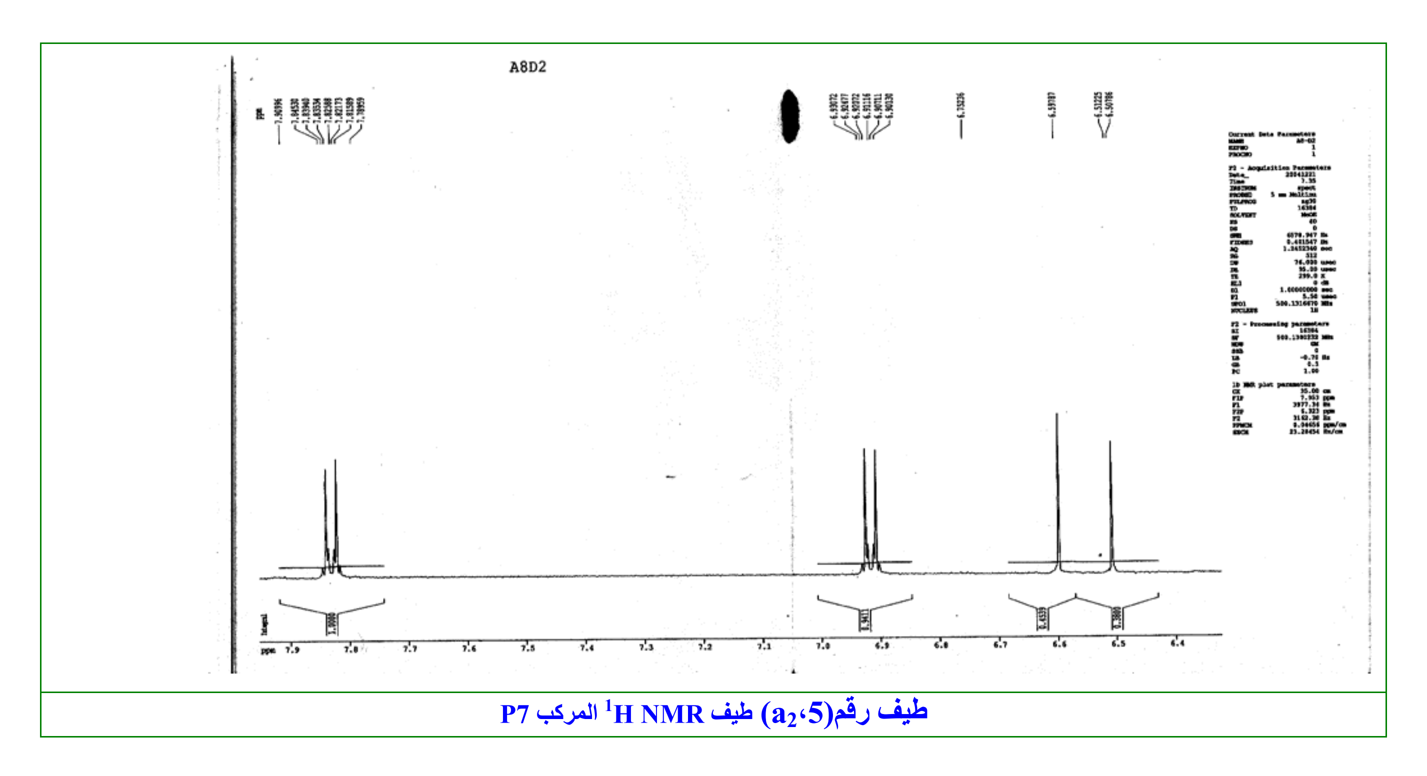
3.4.3 التعيين البنيوي للمركب P7 (8d2)

1.3.4.3 المعطيات المطيافية

يبين طيف الرنين المغناطيسي النووي للبروتون (طيف رقم a_1,5 ؛ a_2,5، a_3,5 ، a_4,5) وكذا طيف الكربون (b,5) أن المركب P7 لا يعتبر مركبا مفردا نقيا نظرا لوجود إشارات في مجال حقول قويـة بتكامل معتبر مقارنة بتكامل إشارات البروتونات العطرية الخاصة بالهيكل الفلافونيدي. وقد اسـتدعى هذا القيام بتنقية المركب P7 بإستعمال Sephadex LH20. وتوضح أطياف البروتون (طيف رقم c,5)، وطيف الكاربون (طيف رقم d,5) أن المركب P71 عبارة عن اميد. أما المركب P73 فهو عبارة عـن فلافونيد حامل لمستبدل سكري (طيف رقم e,5، طيف رقم f,5).

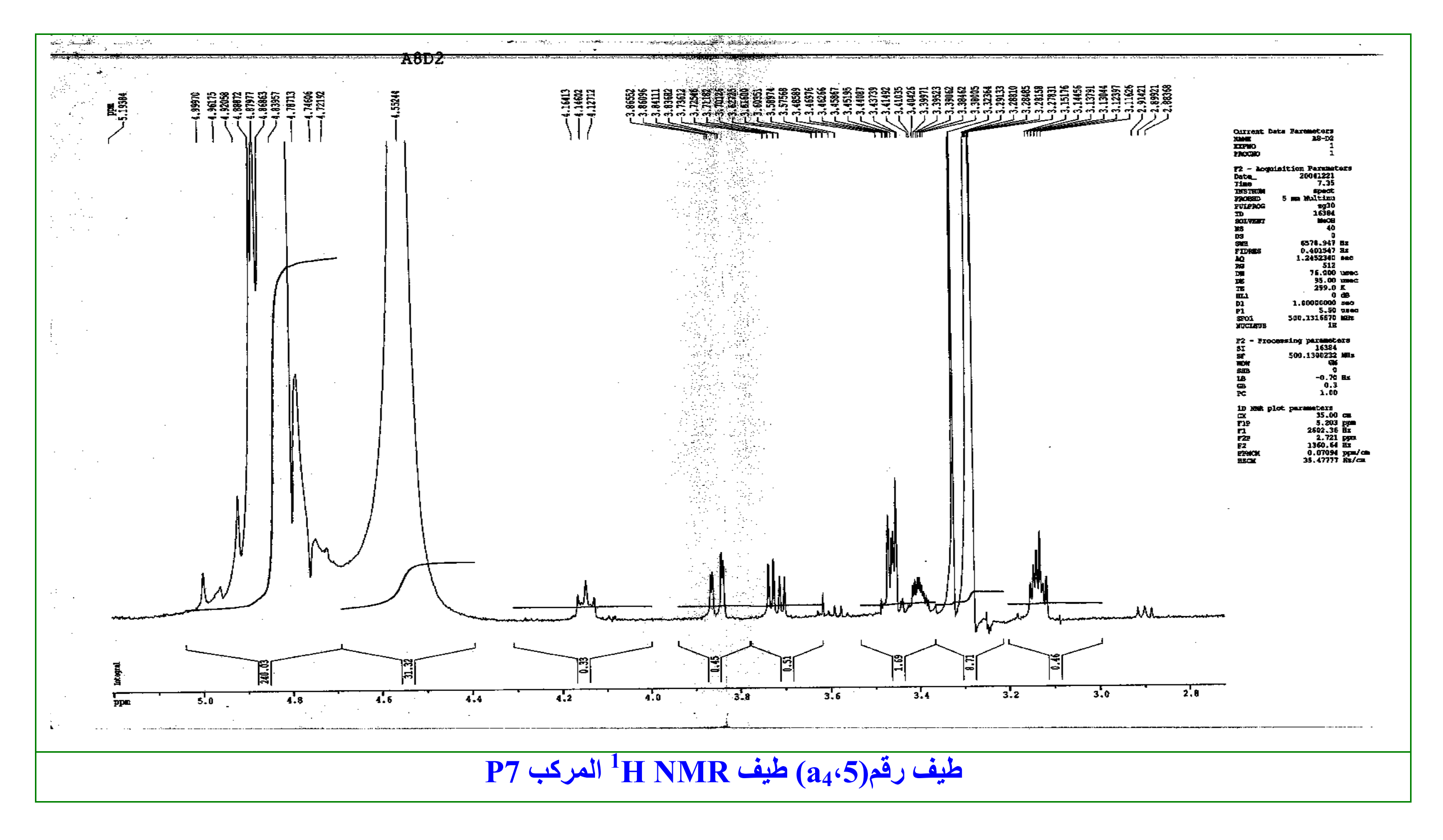


طيف رقم(a_1،5) طيف ^{1}H NMR المركب P7



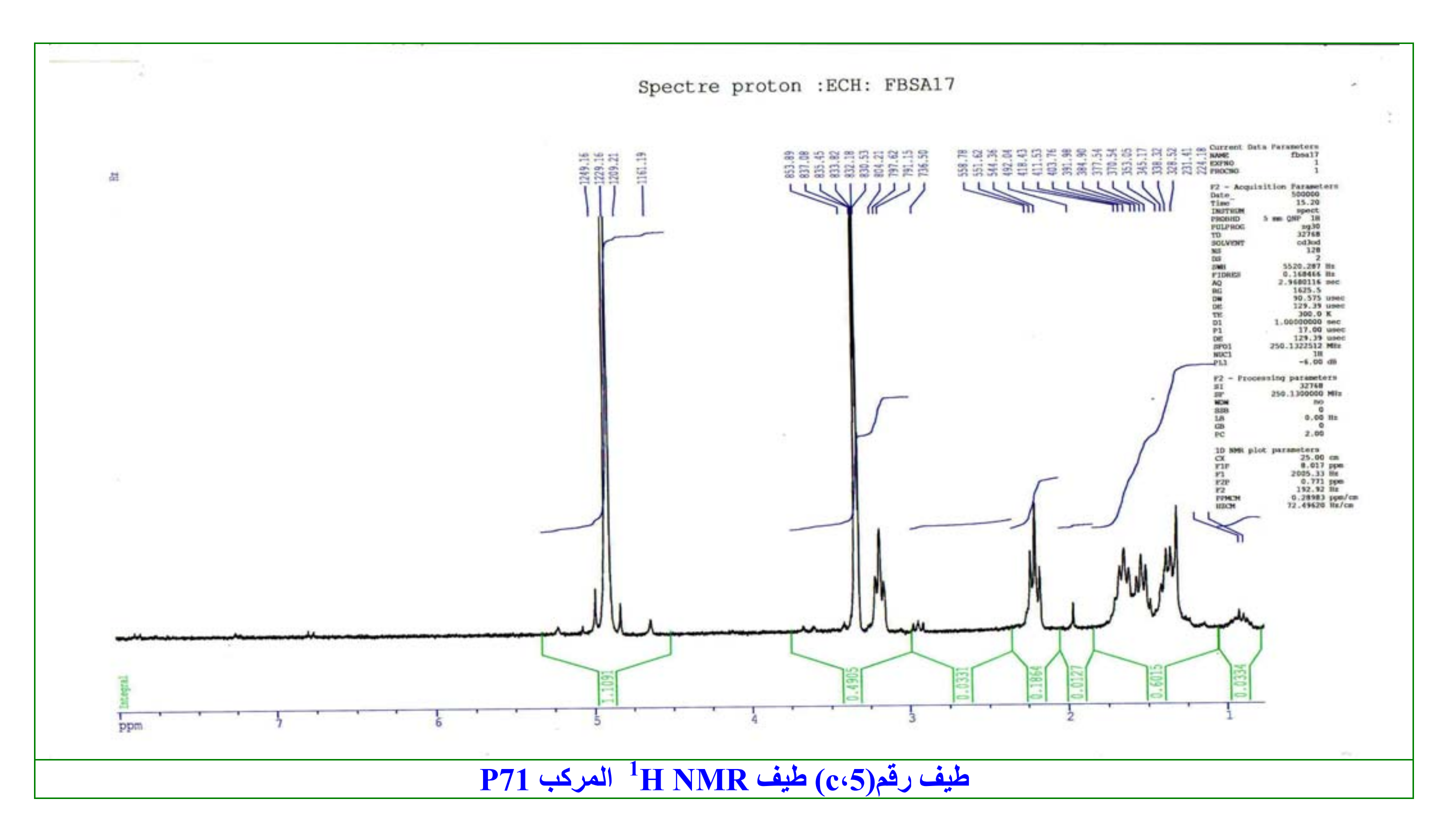
طيف رقم(5،a_2) طيف ^1H NMR المركب P7

طيف رقم(5،a_3) طيف ^1H NMR المركب P7



طيف رقم(5،a_4) طيف ^{1}H NMR المركب P7

طيف رقم(5،b) طيف ^{13}C NMR المركب P7

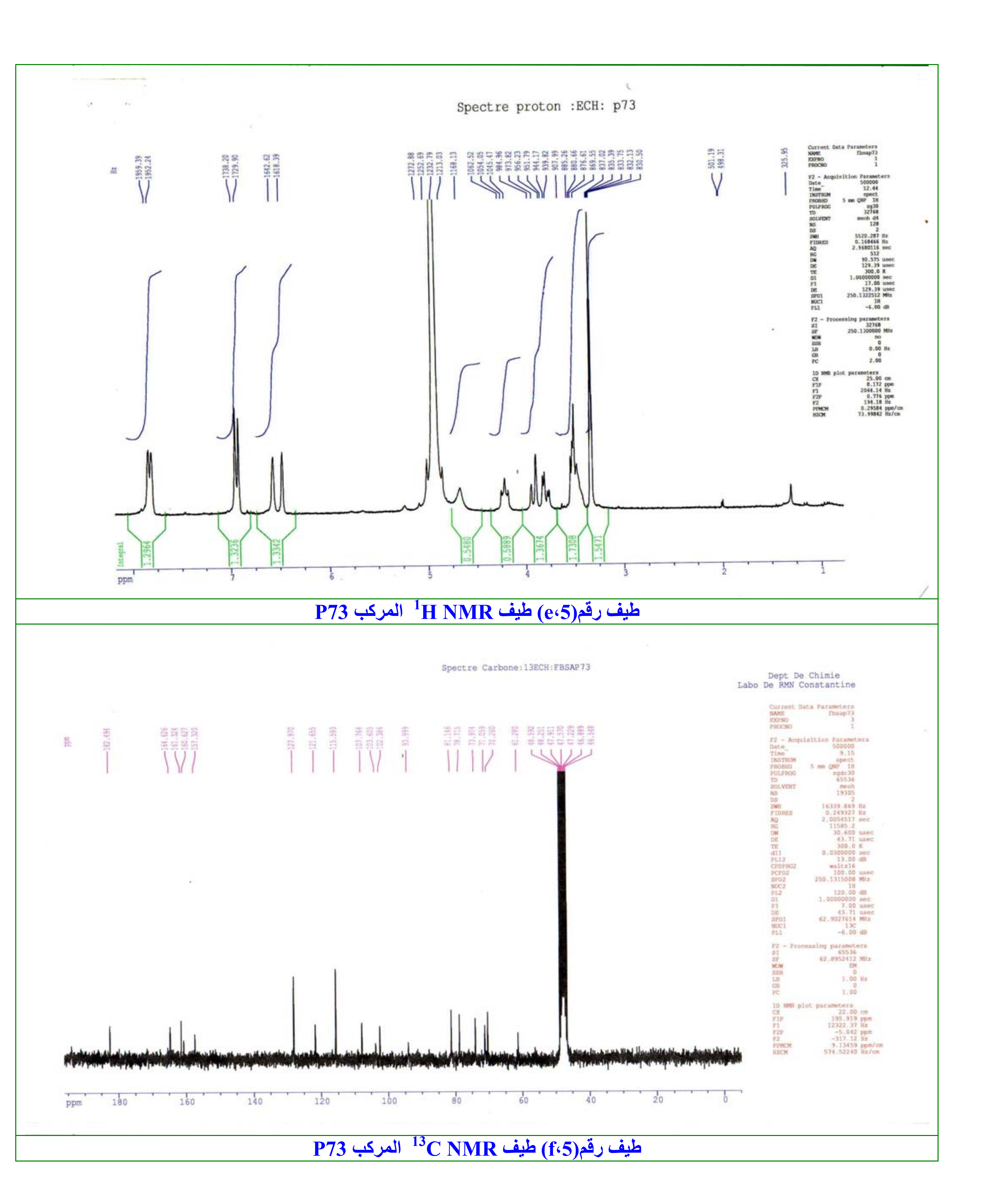


طيف رقم(5،c) طيف ^{1}H NMR المركب P71

Spectre Carbone:13ECH:FBSA P13

Dept De Chimie
Labo De RMN Constantine

طيف رقم(5،d) طيف ^{13}C NMR المركب P71



طيف رقم(5،e) طيف ^{1}H NMR المركب P73

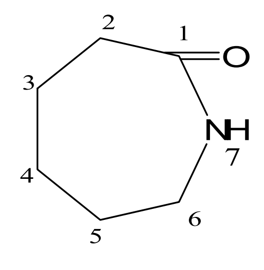
طيف رقم(5،f) طيف ^{13}C NMR المركب P73

1.3.4.3 تحديد معطيات صيغة المركب P71 (المشتق الأميدي).

لتحديد بنية هذا المركب (P71) أستعملنا أطياف: البروتون (طيـف رقـم a_1,5، a_2,5، a_3,5، a_4,5) وطيف الكاربون (b,5) وطيف 135 DEPT (طيف رقم g,5) وأطياف تجربة HMBC (طيف رقم h_1,5، h_2,5، h_3,5، h_4,5) الخاصة بالخليط أي P7 والتي مكنت من تمييز المركب الأميدي P71 بيسـر عـن المركب الفلافونيدي P73. يبين فحص طيف الكاربون 13 (طيف رقم b,5) بغض النظر عن إشارات المركب الفلافونيدي P73 وجود 6 ذرات كربون من بينها إشارة عند δ = 174.68 ppm تنسـب الـى كربونيل وظيفة أميد. أما ذرات الكربون الأخرى فكلها ذات تهجين sp^3 وفي المجال 24.94 و38.78. يبين طيف 135 DEPT (طيف رقم g,5) أن كل هذه الذرات الكربونية الخمس من النوع CH_2. ومـن جهة أخرى يبين طيف تجربة HMBC (طيف رقم رقم h_1,5، h_2,5، h_3,5) ما يلي :

- اقتران بين كل من كاربون المجموعة CO وبروتونات الإشارة المتعددة عند δ = 3.13 ppm والخاصة بالمجموعة CH_2 المجاورة لذرة الأزوت.
- اقتران كاربون الكاربونيل وبروتونات المجموعة CH_2 عند δ = 2.15 ppm المجاورة له
- اقتران بين كاربون مجموعة الكاربونيل وبروتوني المجموعة CH_2 التي تقع في الموقع β بالنسبة للكاربونيل.

مما يقود إلى الصيغة المحتملة:

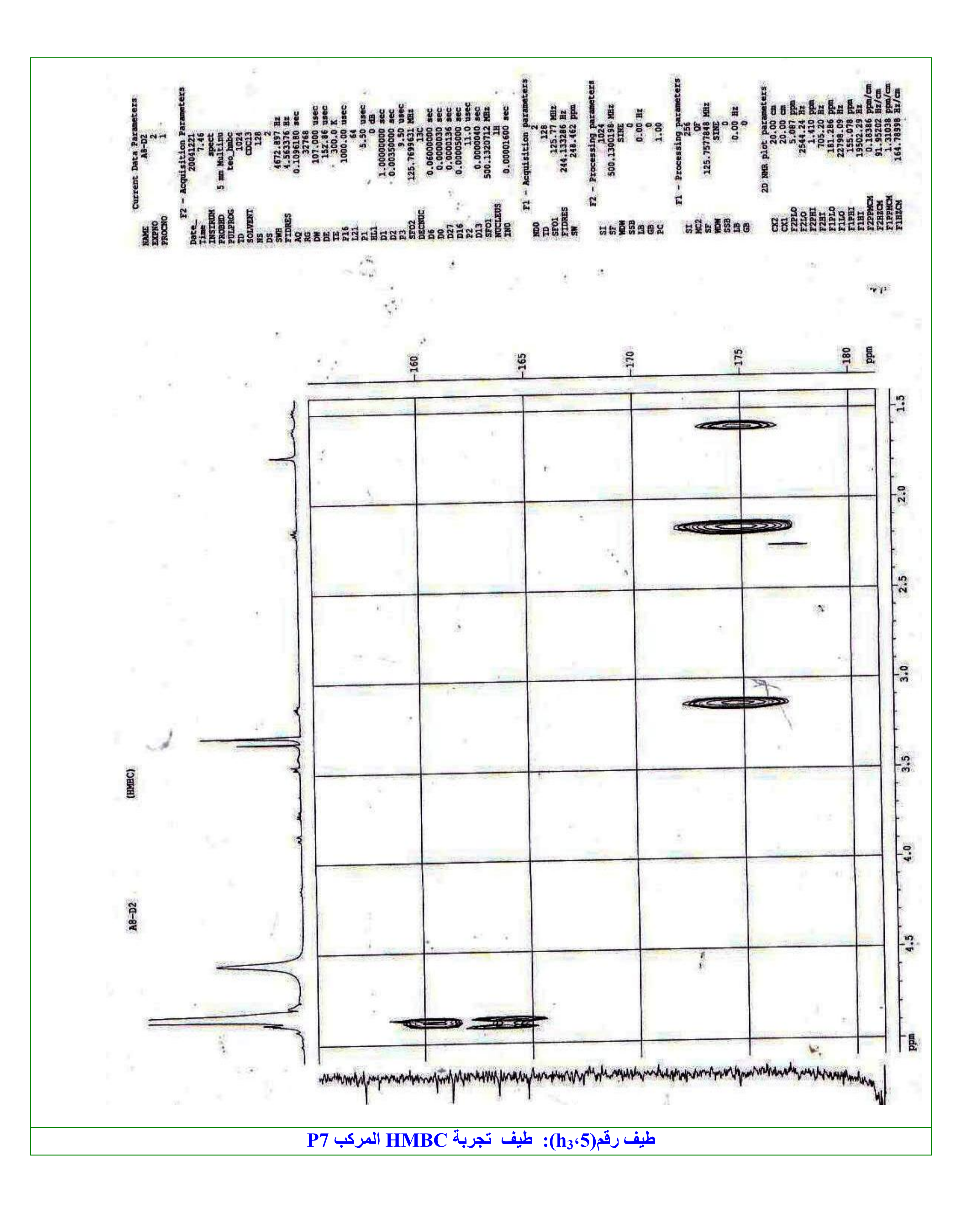


تدون كل هذه المعطيات بالجدول 12.C

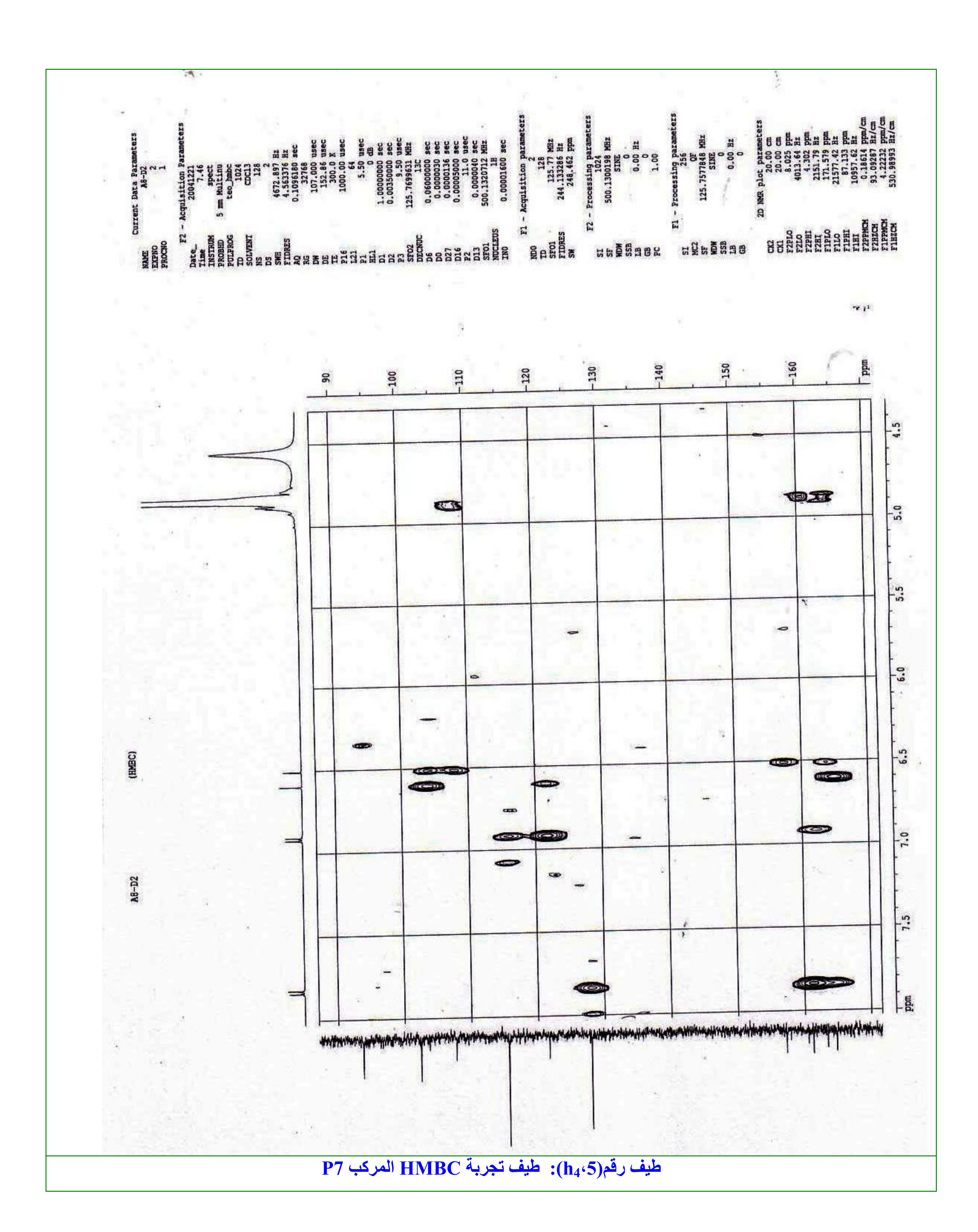
جدول (12.C) : معطيات الرنين النووي المغناطيسي للمركب P71 (طيف رقم ، a,5 ،b,5 ، g,5، h,5)

النواة	δc (ppm) (CD$_3$OD ،125*MHz*)	Dept 135	δ_H , mult (*J* بـ Hz) (CD$_3$OD ،500*MHz*)	HMBC (*500MHz*) C $\rightarrow$ H
1	174.59	C		6; 2; 3
2	35.49	CH_2	2.15 t (7.6)	3
3	26.03	CH_2	1.59 q^n (7.6)	
4	25.20	CH_2	1.31 q^n (7.6)	
5	28.80	CH_2	1.49 q^n (7.6)	6; 3; 4
6	38.70	CH_2	3.13 m	5
7			1.73 s	

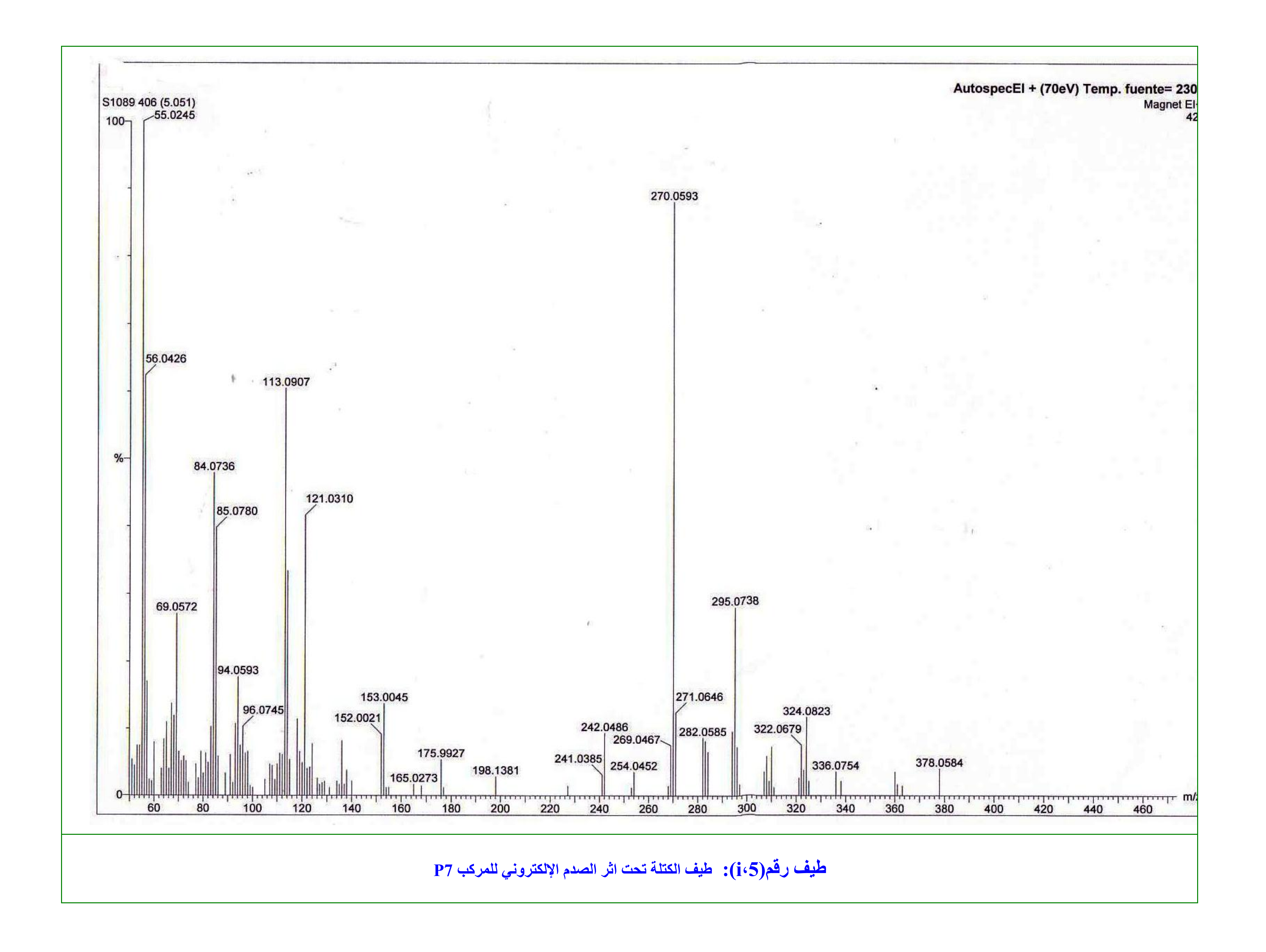
ويتم تأكيد هذه الصيغة بفحص طيف الكتلة (أطياف رقمi,5) تحت أثر الصدم الالكتروني (SMIE) إشارة خاصة بالأيون الجزيئي للأميد عند m/z = 113 الموافقة للصيغة $C_6H_{11}ON$ أي أن هذا المركب يحتوي على اثنين من عدم التشبع. كما يبين هذا الطيف شظايا عند m/z= 85 ، m/z = 84 والخاصة بفقدان $CH_2=CH_2$ و $CH_2=NH$ من طرف الأيون الجزيئي المتأين بأكسيجين الكاربونيل. كما يبين هذا الطيف إشارتين عند m/z = 56 و m/z = 55 خاصتين بتشظية Natalys المميزة للكاربونيلات الحلقية. الأولى ناتجة عن تكسيرة بسيطة α لوظيفة الكاربونيل وتخص الرابطة -CH_2 C=O متبوعة بتحويل H المجموعة (NH) وفقدان جذر $CH_3-CH_2-CH_2-CH_2^{\circ}$ مؤديا إلى الأيون $CH_2=N-C=O^+$. أما بالنسبة للإشارة الثانية أي m/z = 55 فهي الإشارة القاعدية للطيف وتخص التكسيرة البسيطة α للكاربونيل من الجهة الأخرى أي بين ذرة الأزوت وكربون الكاربونيل، تتبع هذه التكسيرة بتحويل H من المجموعة CH_2 المجاورة للكربونيل وفقدان جذر$^{\circ}CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$ مؤديالى الأيون$CH_2=CH-C=O^+$..



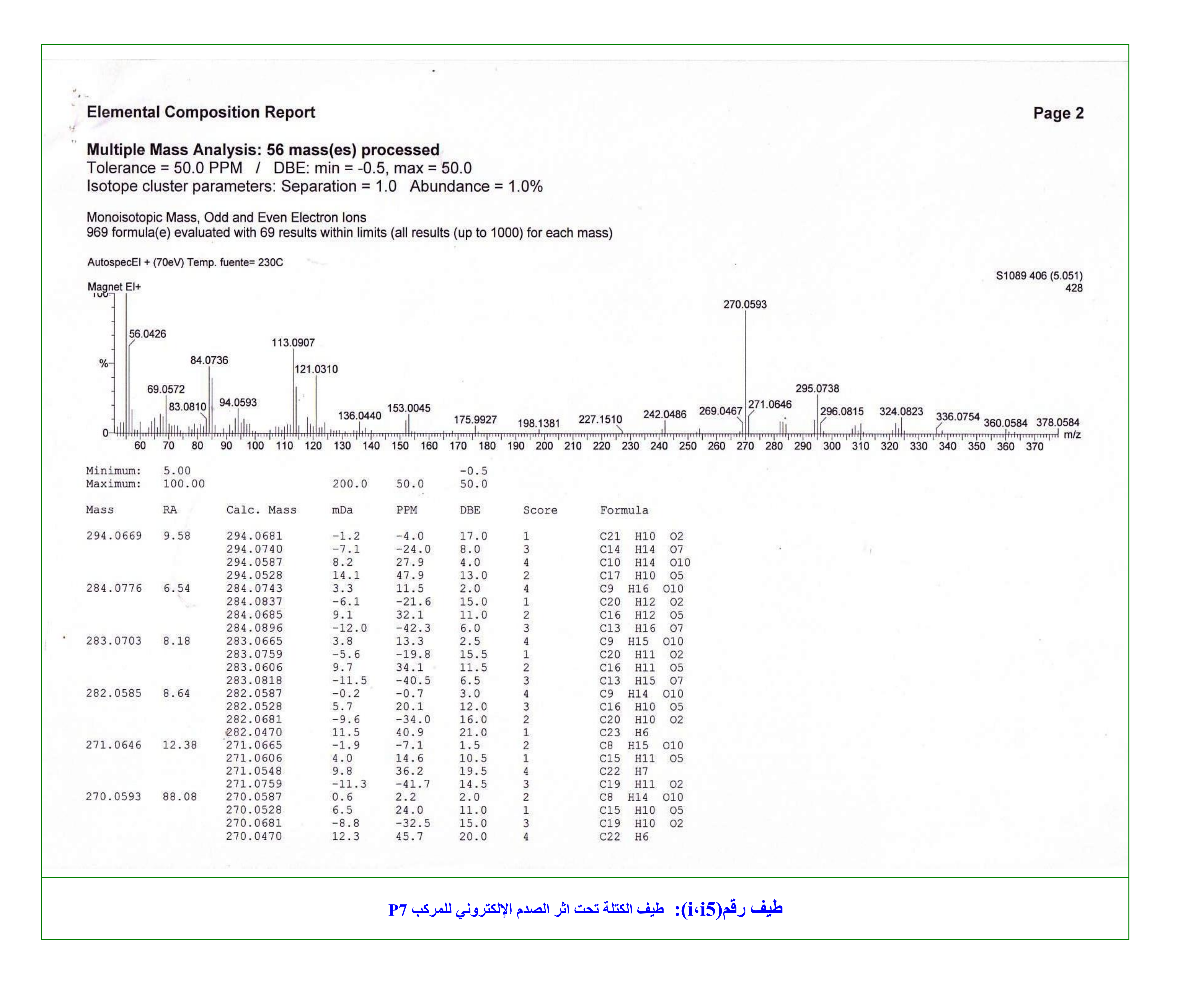
طيف رقم(5،h_3): طيف تجربة HMBC المركب P7



طيف رقم(h$_4$،5): طيف تجربة HMBC المركب P7



طيف رقم(i،5): طيف الكتلة تحت اثر الصدم الإلكتروني للمركب P7



Elemental Composition Report — **Page 2**

Multiple Mass Analysis: 56 mass(es) processed
Tolerance = 50.0 PPM / DBE: min = -0.5, max = 50.0
Isotope cluster parameters: Separation = 1.0 Abundance = 1.0%

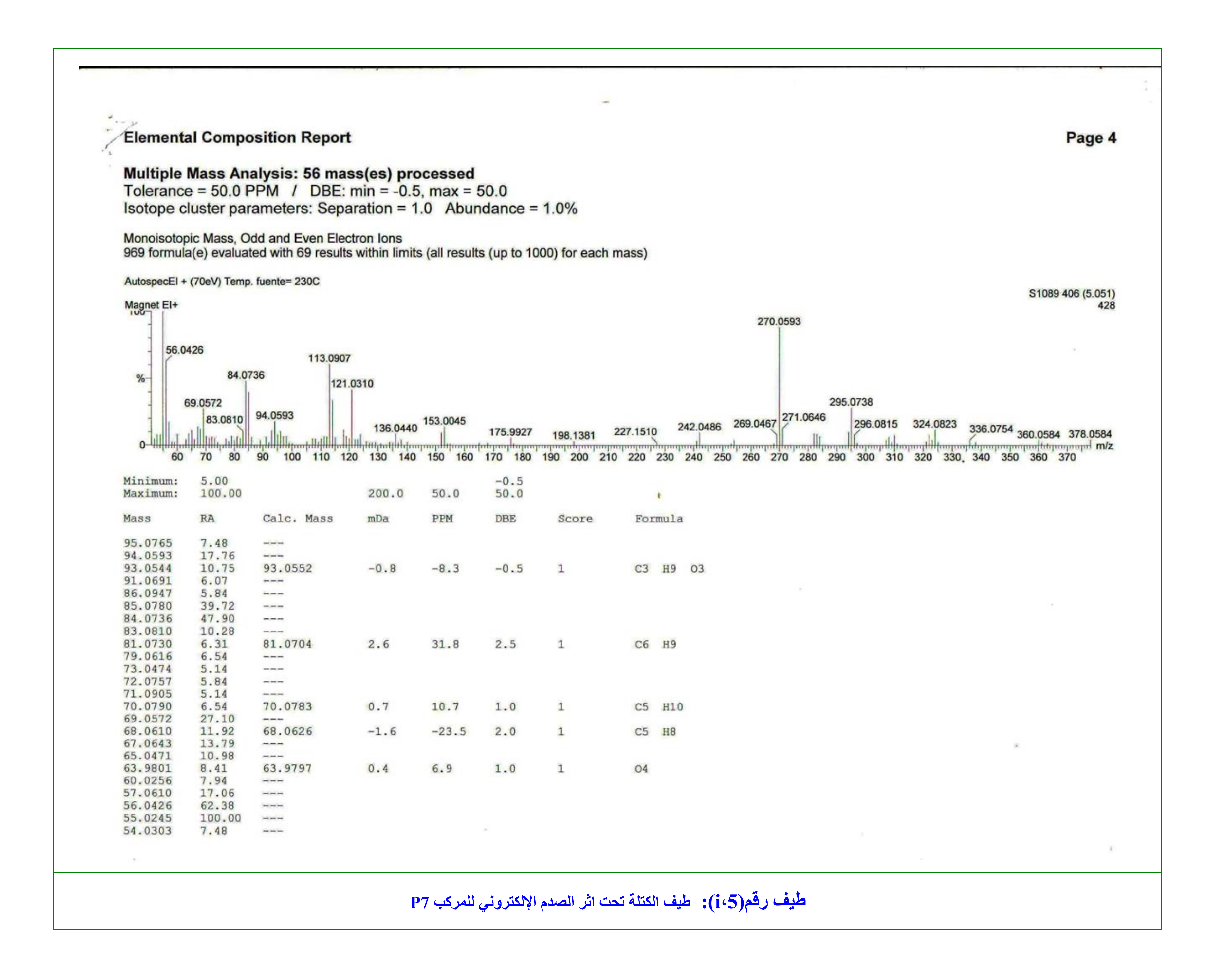
Monoisotopic Mass, Odd and Even Electron Ions
969 formula(e) evaluated with 69 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

AutospecEI + (70eV) Temp. fuente= 230C

			mDa	PPM	DBE		
Minimum:	5.00				-0.5		
Maximum:	100.00		200.0	50.0	50.0		

Mass	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Score	Formula
294.0669	9.58	294.0681	-1.2	-4.0	17.0	1	C21 H10 O2
		294.0740	-7.1	-24.0	8.0	3	C14 H14 O7
		294.0587	8.2	27.9	4.0	4	C10 H14 O10
		294.0528	14.1	47.9	13.0	2	C17 H10 O5
284.0776	6.54	284.0743	3.3	11.5	2.0	4	C9 H16 O10
		284.0837	-6.1	-21.6	15.0	1	C20 H12 O2
		284.0685	9.1	32.1	11.0	2	C16 H12 O5
		284.0896	-12.0	-42.3	6.0	3	C13 H16 O7
283.0703	8.18	283.0665	3.8	13.3	2.5	4	C9 H15 O10
		283.0759	-5.6	-19.8	15.5	1	C20 H11 O2
		283.0606	9.7	34.1	11.5	2	C16 H11 O5
		283.0818	-11.5	-40.5	6.5	3	C13 H15 O7
282.0585	8.64	282.0587	-0.2	-0.7	3.0	4	C9 H14 O10
		282.0528	5.7	20.1	12.0	3	C16 H10 O5
		282.0681	-9.6	-34.0	16.0	2	C20 H10 O2
		282.0470	11.5	40.9	21.0	1	C23 H6
271.0646	12.38	271.0665	-1.9	-7.1	1.5	2	C8 H15 O10
		271.0606	4.0	14.6	10.5	1	C15 H11 O5
		271.0548	9.8	36.2	19.5	4	C22 H7
		271.0759	-11.3	-41.7	14.5	3	C19 H11 O2
270.0593	88.08	270.0587	0.6	2.2	2.0	2	C8 H14 O10
		270.0528	6.5	24.0	11.0	1	C15 H10 O5
		270.0681	-8.8	-32.5	15.0	3	C19 H10 O2
		270.0470	12.3	45.7	20.0	4	C22 H6

طيف رقم(i،i5): طيف الكتلة تحت اثر الصدم الإلكتروني للمركب P7



Elemental Composition Report

Page 4

Multiple Mass Analysis: 56 mass(es) processed
Tolerance = 50.0 PPM / DBE: min = -0.5, max = 50.0
Isotope cluster parameters: Separation = 1.0 Abundance = 1.0%

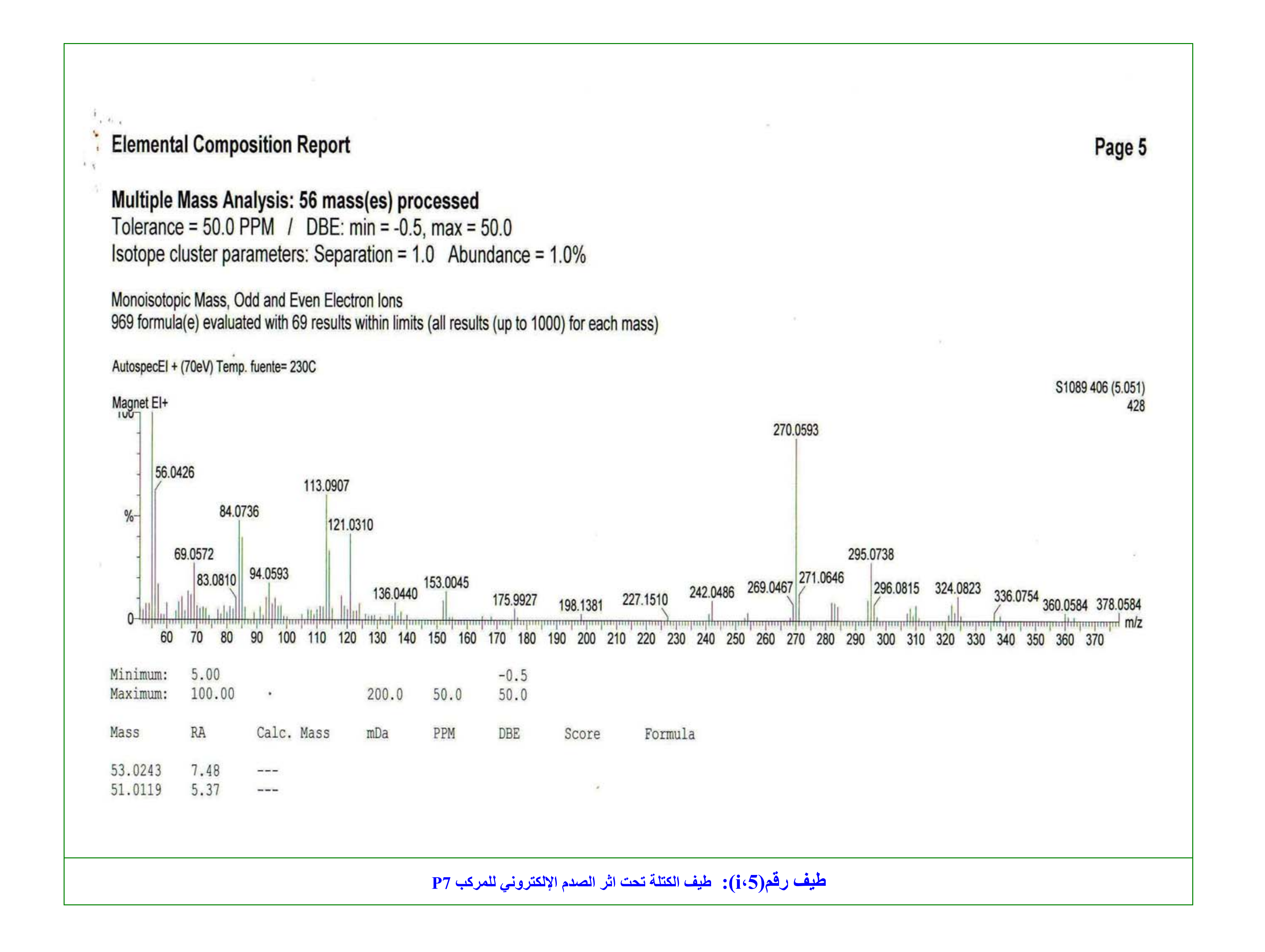
Monoisotopic Mass, Odd and Even Electron Ions
969 formula(e) evaluated with 69 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

AutospecEI + (70eV) Temp. fuente= 230C

	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Score	Formula
Minimum:	5.00				-0.5		
Maximum:	100.00		200.0	50.0	50.0		

Mass	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Score	Formula
95.0765	7.48	---					
94.0593	17.76	---					
93.0544	10.75	93.0552	-0.8	-8.3	-0.5	1	C3 H9 O3
91.0691	6.07	---					
86.0947	5.84	---					
85.0780	39.72	---					
84.0736	47.90	---					
83.0810	10.28	---					
81.0730	6.31	81.0704	2.6	31.8	2.5	1	C6 H9
79.0616	6.54	---					
73.0474	5.14	---					
72.0757	5.84	---					
71.0905	5.14	---					
70.0790	6.54	70.0783	0.7	10.7	1.0	1	C5 H10
69.0572	27.10	---					
68.0610	11.92	68.0626	-1.6	-23.5	2.0	1	C5 H8
67.0643	13.79	---					
65.0471	10.98	---					
63.9801	8.41	63.9797	0.4	6.9	1.0	1	O4
60.0256	7.94	---					
57.0610	17.06	---					
56.0426	62.38	---					
55.0245	100.00	---					
54.0303	7.48	---					

طيف رقم(5،i): طيف الكتلة تحت اثر الصدم الإلكتروني للمركب P7



طيف رقم(i،5): طيف الكتلة تحت اثر الصدم الإلكتروني للمركب P7

2.3.4.3 التحديد البنيوي للمركب P73 (8D2)

جدول (13.C): مطيافية الرنين المغناطيسي النووي لبروتون ^{1}H NMR (CD$_3$OD ،500 *MHz*) للمركب P73 .أ طياف رقم (a$_1$،5) ، (a$_2$،5)، (a$_4$،5).

إزاحة كميائية (δ ppm)	التعددية	ثابت التزاوج (*J*, Hz)	التكامل	التوزيع
7.83	ثنائي	8.8	2H	H-2´, H-6´
6.91	ثنائي	8.8	2H	H-3´, H-5´
6.59	أحادي		1H	H-3
6.51	أحادي		1H	H-6 أوH-8
4.85	ثنائي	9.2	1H	H-1"
4.14	ثلاثي	9.2	1H	H- 2"
3.85	ثنائي ثنائي	12.2 ، 2.8	1H	H-6" a
3.72	ثنائي ثنائي	12.2 ، 5.3	1H	H-6" b
3.47-3.38	متعدد		3H	H-3", H-4", H-5"

جدول (14.C): مطيافية الكتلة عالية الكفاءة تحت الصدم الإلكتروني (HREIMS) للمركب P73 أطياف رقم (i،5)

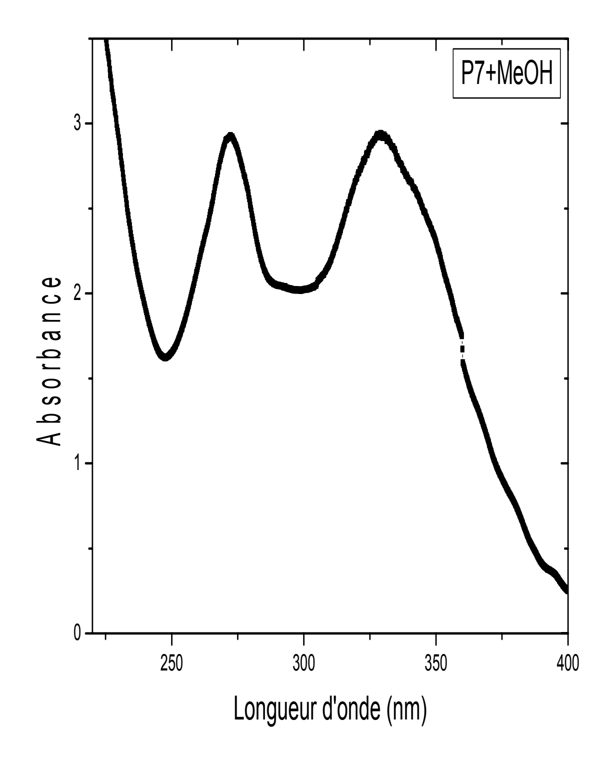
الصيغة المجملة	$C_{15}H_{10}O_5$	$C_6H_{11}O_5$	$C_7H_5O_2$	C_8H_6O
الشظايا الموافقة	Apigenin	aglycone-CH^{+}_2	B^{+}_2	$B^{+\circ}_1$
m/z	270.0593	283.0703	121.0310	118.0437
الشدة النسبية	100	9.30	47.26	13.01

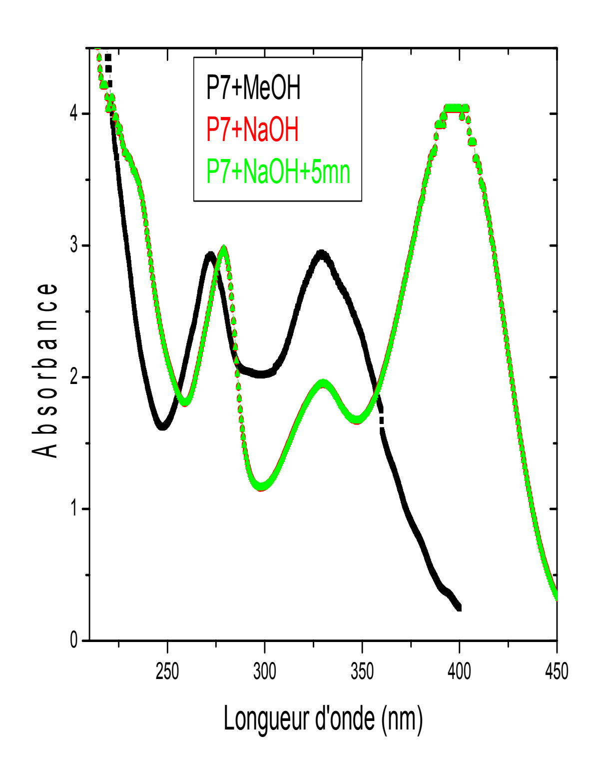
جدول (15.C) : مطيافية امتصاص الأشعة فوق البنفسجية – المرئية للمركب P73 (طيف رقم 6)

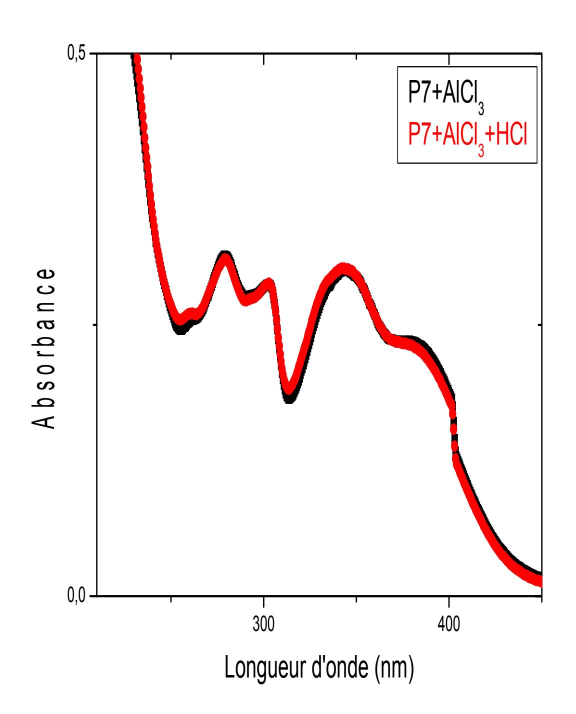
الكواشف	الطول الموجي nm		
	عصابة II	نتوءات أخرى	عصابة I
MeOH	272		328
NaOH	279	330	399
$AlCl_3$	279		398
$HCl/ AlCl_3$	279	384	398
NaOAc	278		390
H_3BO_3/ NaOAc	279		398
NaOH	مستقر بعد 5 دقائق		

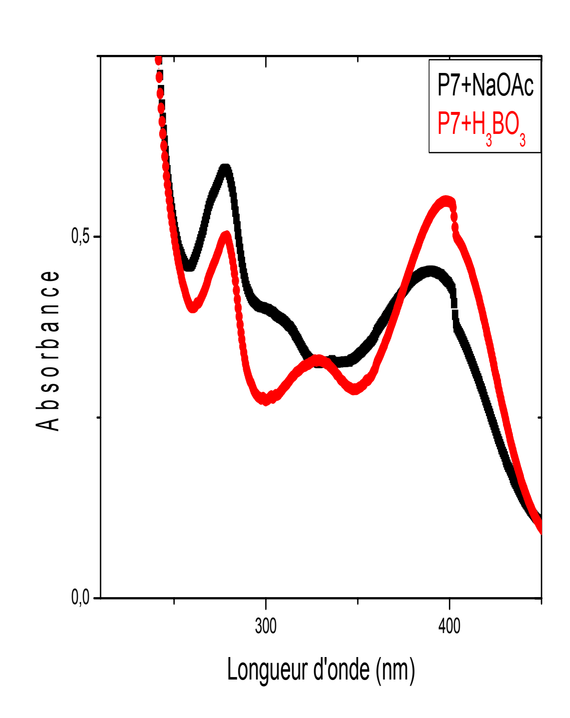
جدول (16.C): مطيافية الرنين المغناطيسي النووي ^{13}C NMR (125 *MHz*، CD_3OD) للمركب P73 (طيف رقم b,5)

	إزاحة كيميائية (δ ppm)	التوزيع
كاربون apigenin	182.49	C-4
	164.78	C-2
	163.41	C-7
	161.28	C-4'
	160.53	C-9
	157.25	C-5
	127.98	C-2', C-6'
	121.64	C-1'
	115.57	C-3', C-5'
	107.70	C-8
	103.60	C-10
	102.38	C-3
	93.75	C-6
الكاربون السكري	81.1	C-5''
	78.61	C-3''
	73.75	C-1''
	71.04	C-2''
	70.24	C-4''
	61.32	CH_2-OH









طيف رقم (6) : مطيافية امتصاص الأشعة الفوق البنفسجية – المرئية للمركب P73 (8D2)

التعليل :

يبين طيف الكاربون 13 (طيف رقم b,5) للمركب P7 وبغض النظـر عـن إشـارات المركـب الأميدي وجود مركب فلافونيدي حامل لمستبدل سكري برابطة (C-C) بناءا علـى وجـود إشـارة الكاربون الأنوميري عنـد δ = 73.75 ppm المميـزة لهـذا الاسـتبدال. ويـدلي الطيـف أيضـا بوجودمجموعة CH_2OH والخاصة بالمستبدل السـكري عنـد δ = 61.32 ppm و4 مجموعـات CH مؤكسجة عند(ppm) δ = 81.1 (C-5'')، 78.61 (C-3'')، 71.04 (C-2'')، 70.24 (C-4''). توافـق هذه المعطيات مستبدل من نوع جلوكوز. إضافة إلى الإدلاء بإشارات الجلوكوز فإن طيف البروتـون (طيف رقم $a_{1,5}$، $a_{2,5}$، $a_{3,5}$، $a_{4,5}$) يحمل أيضا إشارات: نظام AB بتكامل 2H لكل ثنائي (*J* = 8.8 Hz) عند كل من δ = 7.83 و6.91 ppm والتي يمكن أن تنسب إلى كل من H-2'، H-6´ و H-3'،H-5' على التوالي للهيكل الفلافونيدي.

ويظهر بهذا الطيف أيضا وجود إشارتين أحاديتين عند δ = 6.59 و6.51 ppm والتي يمكن أن تعود إلى H-3 وH-6 أو H-3 وH-8 نظرا لغياب تزاوج ميتا .

يبين فحص طيف الكتلة ذي الكفاءة العالية (أطياف رقم i,5) الإشارات الآتية: إشارة قاعدية عنـد *m/z* = 270.0593 وهي موالية للصيغة $C_{15}H_{10}O_5$ ذات القيمة المحسوبة 270.0528 المبررة لوجود الهيكل الفلافونودي من النوع apigenin . كما يبين هذا الطيف أيضا وجود أيـون خـاص بتشـظية الفلافونات الحاملة للجلوكوز بواسطة الرابطة (C-C) عند *m/z*= 283.0703 والموافقة للصيغة المجملة $C_{16}H_{11}O_5$ ذات القيمـة المحسـوبة 283.0606 والممثلـة للـ ـ apigenin المتصـل بمجموعـة $(C_{15}H_9O_5)CH_2^+$. إضافة إلى هذه الإشارات فإن الطيف يحمـل إشـارات عنـد *m/z* = 121.0310 والموافقة للصيغة المجملة : $C_7H_5O_2$ ذات القيمة المحسوبة 121.0290 والتي يمكن أن تنسـب إلـى الشظية B_2^+ والخاصة بتفكك الفلافونات، ويؤكد هذه النتيجة وجود مجموعة هيدروكسيل واحدة فـوق الحلقة B؛ هذا ما يؤكده أيضا وجود الإشارة عند *m/z* = 118.0437 والموافقـة للصـيغة المجملـة C_8H_6O ذات القيمة المحسوبة 118.0419 والخاصة بـالأيون $B_1^{+\cdot}$ الناجمـة عـن إعـادة ترتيـب الفلافونات.

إن حصيلة هذه النتائج تقود إلى اعتبار هذه المركب عبارة عن apigenin مسـتبدل بـالجلوكوز بواسطة رابطة C-C بالموضع C-6 أو بالموضع C-8. ويلجأ إلى تحليل طيفNMR ثنائي البعد عبـر تجربة HMBC (طيف رقم $h_{3,5}$، $h_{4,5}$) لإمكانية تحديد موضع السـكر حيـث يمكـن اسـتخلاص الملاحظات الآتية :

- بفحص طيف تجربة HMBC يتبين وجود اقتران بين كل من البروتونين H-3' وH-5' مع ذرات الكربون عند δ =121.64 ppm و δ =161.28 ppm؛ ووفقا للإزاحة الكيميائية يمكن أن تعود هاتان الذرتان إلى C-1' وC-4' على التوالي.

- يقود تحديد 'C-1 الى تحديد H-3 عند δ = 6.59 ppm نظرا لوجود إقتران بين هاتين النواتين.
- إن H-3 المقترن بـ ´C-1 يقترن مع ذرتي كاربون عند δ = 103.72 ppm

وδ =164.78 ppm حسب الإزاحة الكميائية يمكن نسبهما لـ C-10 وC-2 على التوالي.

بافتراض أن البروتون المحمول بالحلقة A يتموقع بالموضع C-6 ، وبمتابعة دراسة طيف HMBC يسمح بتعيين ما يلي : C-6 وC-8 عند كل من δ =93.75 ppm،

δ =107.705 ppm على التوالي، وبناء على الإزاحة الكيميائية واقتران H-6 وC-8 يمكن تعيين C-5 وC-7 لاقترانهما بـ H-6.

إن هذه الافتراضية أي التموضع (H-6) تعني وجود مستبدل سكري بالموضع C-8. وباستعمال تعالق "H-1 (البروتون الأنوميري) يمكن الفصل بين C-7 وC-5 نظرا لوجود تعالق بين C-7 و الكاربون الأنوميري وبالتالي يمكن نسب C-5 إلى الإشارة δ =157.25 ppm وC-7 إلى الإشارة δ = 163.41 ppm. كما يبين هذا الطيف تعالق بين البروتون الأنوميري وكاربون رباعي عطري مؤكسج عند δ = 160.53 ppm لا يمكن نسبه إلاّ لـ C-9 (طيف رقم $h_{3,5}$، $h_{4,5}$).

و بالرجوع إلى المعطيات البيبليوغرافية نجدها تتطابق تماما مع نتائج المطيافية الخاصة بالـ vitexin (Combier وآخرون، 1976) .

على حين يقود افتراض تموقع المستبدل السكري بالموضع 6 (isovitexin) إلى نتائج جد مغايرة مع دراسات الآخرين.

تؤكد سلسلة أطياف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية المدونة بالجدول (15.C) وطيف رقم6 هيكل فلافونيدي للـ apigenin كما يلي :

- اللون البنفسجي تحت الأشعة UV وقيمة العصابة I في الميثانول λ_{max} = 328 nm تشير إلى أن المركب عبارة عن فلافون.
- الإزاحة الباتوكرومية للعصابةI في وجودNaOH مقارنة مع الطيف الميثانول (Δλ =+71nm) مع زيادة في الشدة الضوئية تؤكد وجود OH حر بالموضع ´C-4.
- ظهور قمة جديدة في نفس الطيف (NaOH) عند 330 nm يدل على وجود OH حر بالموضع C-7.
- الإزاحة الباتوكرومية للعصابة II في وجود NaOAc مقارنة مع طيف الميثانول (Δλ = +6 nm) يؤكد وجود OH حر بالموضع7.
- مقارنة الطيف المسجل في وجود($AlCl_3$ + HCl) مع طيف الميثانول يظهر إزاحة باتوكرومية للعصابة I (Δλ = +70nm) يدل على وجود OH حر في C-5 وغياب مجموعة أوكسجينية بالموضع C-6.

بناء على كافة معطيات أطياف UV , HMBC , NMR و المدونة بالجداول (13.C ، 14.C ، 15.C ، 16.C) تكون الصيغة كما يلي :

4.4.3 التعيين البنيوي للمركب 114

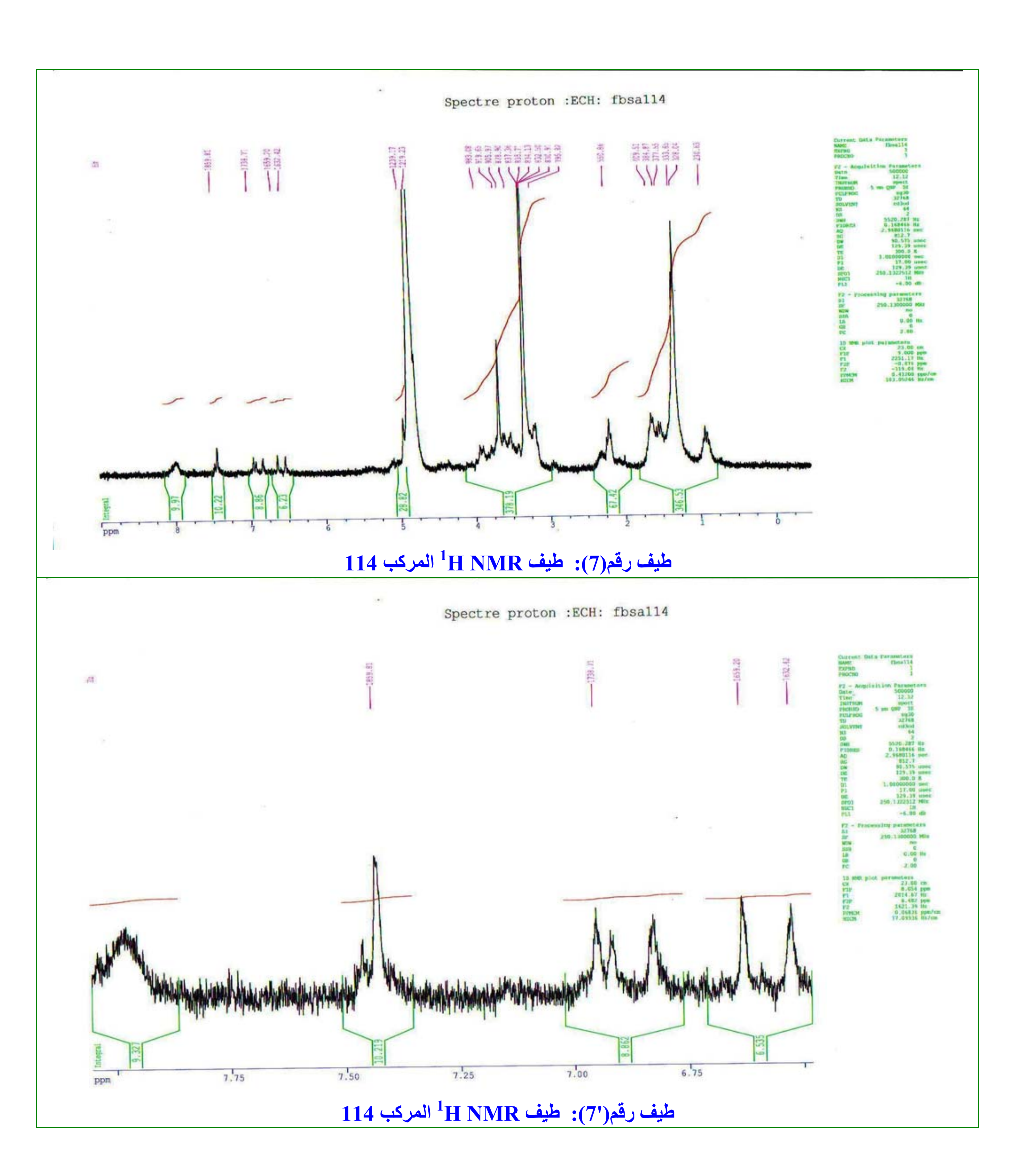
1.4.4.3 معطيات المطيافية

جدول (17.C) : مطيافية الرنين المغناطيسي النووي لبروتون ^{1}H NMR في (CD_3OD ،250 *MHz*) للمركب114 (طيف رقم7 ، ´7).

التوزيع	التكامل	ثابت التزاوج (*J*, Hz)	التعددية	إزاحة كميائية(δ ppm)
H-6´	1H	8.6 ، 2.0	ثنائي ثنائي	7.45
H-2´	1H	2.0	ثنائي	7.43
H-5´	1H	8.6	ثنائي	6.93
H-8	1H		أحادي عريض	6.83
H -3	1H		أحادي	6.63
H-6	1H		أحادي عريض	6.53
O-CH_3	3H		أحادي	3.68

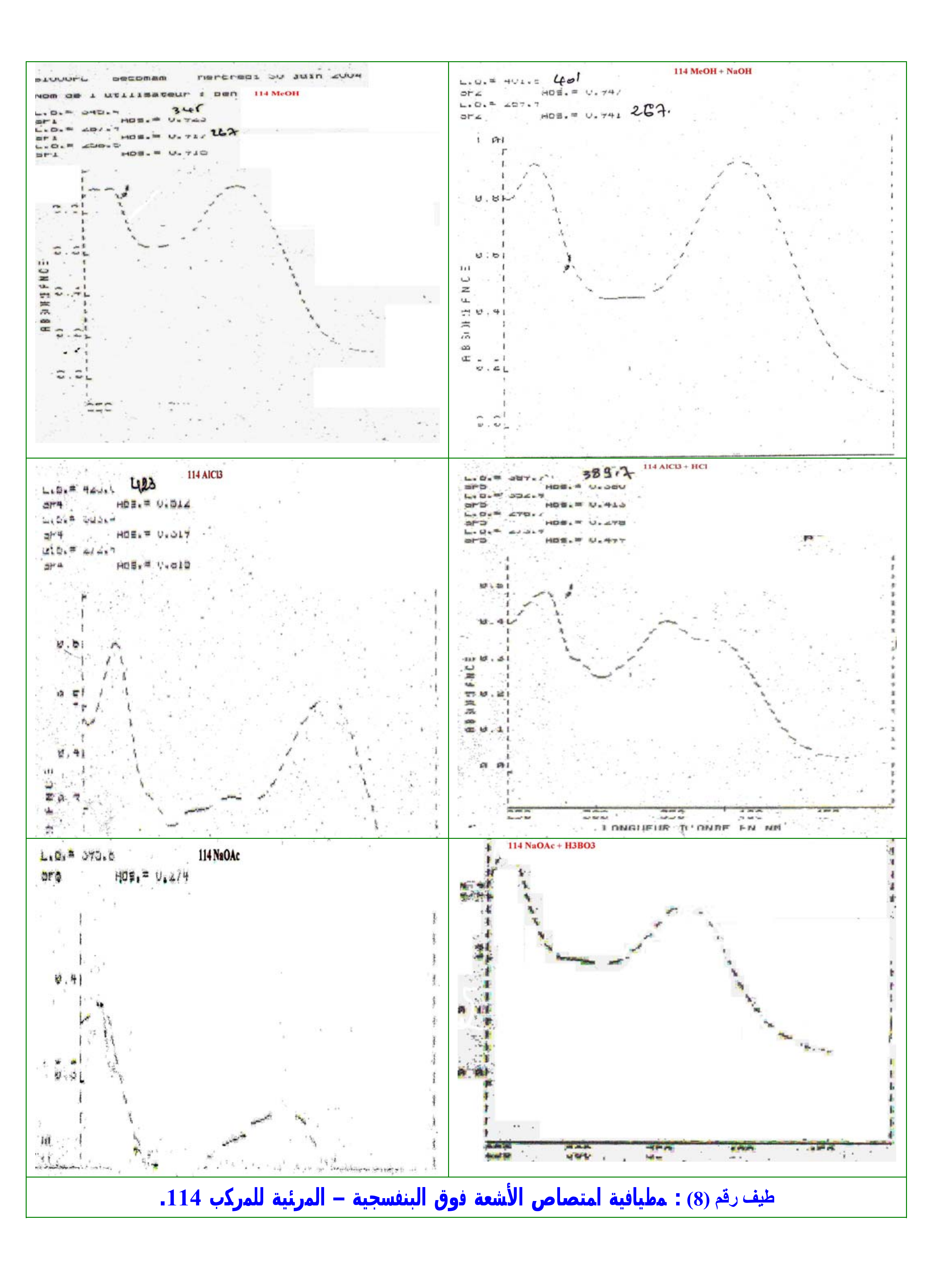
جدول (18.C): مطيافية امتصاص الأشعة فوق البنفسجية – المرئية للمركب 114.

الطول الموجي nm			الكواشف
عصابة I	نتوءات أخرى	عصابة II	
345		267	MeOH
400		269	NaOH
423		272	$AlCl_3$
390		273	$AlCl_3$/HCl
395		265	NaOAc
374		261	NaOAc /H_3BO_3
مستقر بعد 5 دقائق			NaOH



طيف رقم(7): طيف ^{1}H NMR المركب 114

طيف رقم('7): طيف ^{1}H NMR المركب 114



طيف رقم (8) : مطيافية امتصاص الأشعة فوق البنفسجية – المرئية للمركب 114.

التعليل :

يبين طيف ^{1}H NMR (طيف رقم7 و'7) وجود إشارة ثنـائي ثنـائي (J = 8.6; 2.0 Hz) عنـد δ = 7.45 ppm متداخلة مع إشارة ثنائي (J = 2.0 Hz) عند δ = 7.43 ppm تنسب إلى كل من H-6´ و H-2´ على التوالي. كما يبين إشارة ثنائية بثابت تزاوج J =8.6 Hz عند δ = 6.93 ppm تنسـب إلـى H-5´ إضافة إلى ظهور ثلاث إشارات بتكامل 1Hعند δ = 3.68 ppm وδ = 6.63 ppm و6.53 ppm δ= يمكن نسبها الى كل من H-8، H-3، H-6 على التوالي.

كما أن ظهور إشارة أحادية بتكامل 3H عند δ = 68 ppm يكون خاصا بمجموعة ميتوكسيل. تفي هذه المعطيات بأن المركب عبارة عن فلافون مستبدل في المواضع 5، 7، ´4، ´3 حيث تكون طبيعة هذه المستبدلات عبارة عن مجموعة من ميتوكسيل وثلاث مجاميع هيدروكسيلية. ولتحديد تموضع هذه المستبدلات انطلاقا من اللون الاستشعاعي البنفسجي نلجأ إلى سلسلة أطياف الأشعة فـوق البنفسـجية، حيث يبين الطيف (رقم) المسجل بالميثانول وجود عصابة I عند λ_{max} = 345 nm طيف رقم ( ) مما يؤكد أن المركب عبارة عن فلافون. إن الإزاحة الباتوكرومية للعصابة I ($\Delta\lambda$ = 55 nm) مـع زيـادة الشدة الضوئية بعد إضافة NaOH يدل على وجود OH حر بالموقع´4. كما أن عدم ظهـور عصـابة جديدة بهذا الطيف بالمجال 310 إلى 335 nm يدل على غياب OH حر بالموقع7 ، ونظـرا لوجـود مجموعة منفردة من الميتوكسيل فهي إذن تحتل هـذا الموقـع. إن مقارنـة طيـف $AlCl_3$ وطيـف $AlCl_3$+HCl يبين وجود نظام أورثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة B؛ أي 3´-4´-diOH ، على حـين تبين مقارنة طيف $AlCl_3$ + HCl بطيف الميثانول إزاحة باتوكرومية بقيمـة $\Delta\lambda$ = 45 nm كـون أن المركب به مجموعة OH حرة بالموقع5، إضافة إلى غياب مجموعة أوكسيجينية على الموقع6. تـدون كافة هذه المعطيات بالجداول (C.17، C.18). ومن مجموع هذه المعطيـات يمكـن أن تكـون البنيـة المقترحة للمركب 114 كما يلي :

5.4.3 التعيين البنيوي للمركب11E

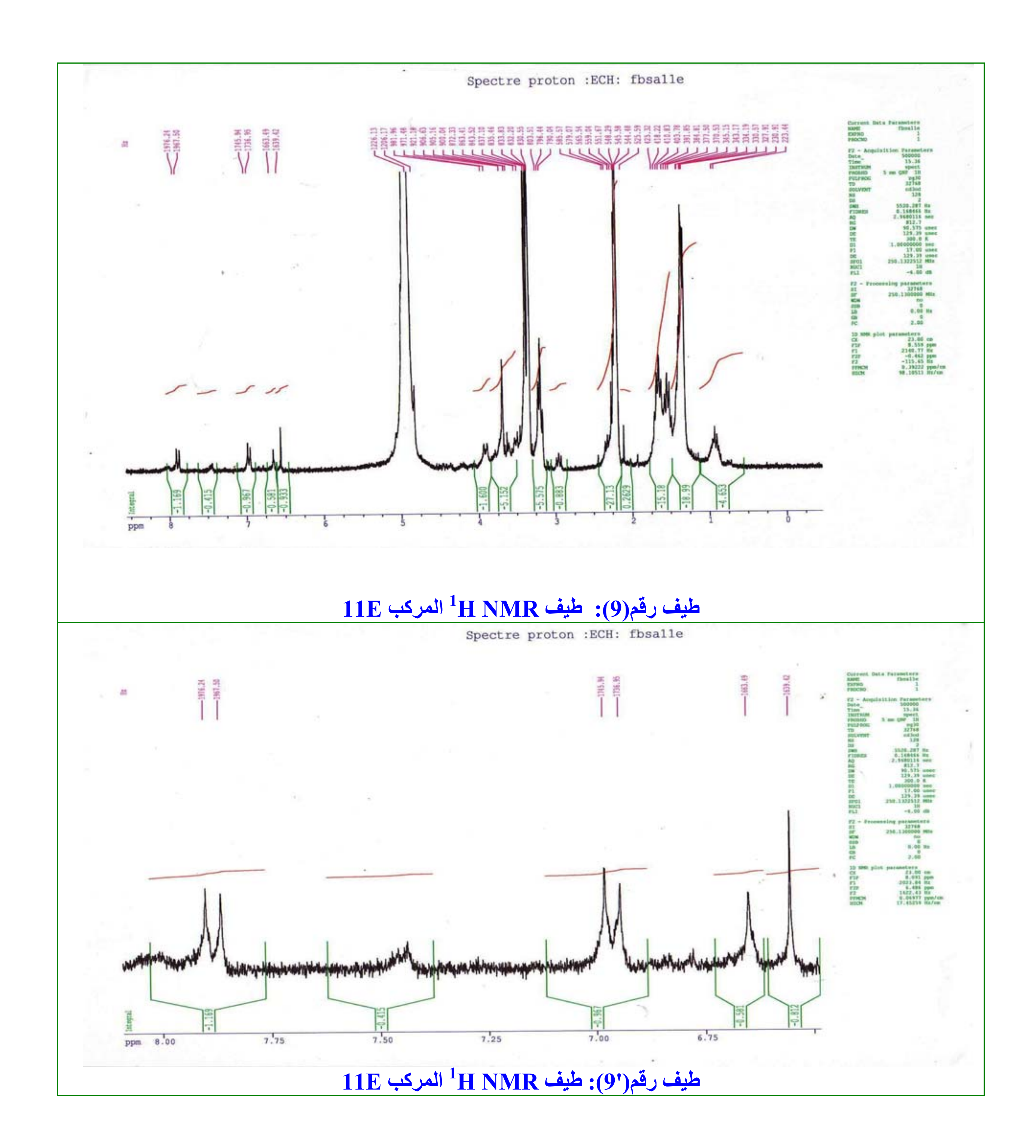
1.5.4.3. معطيات المطيافية

جدول (19.C) : مطيافية الرنين المغناطيسي النووي لبروتون ^{1}H NMR في (CD_3OD ،250 *MHz*) للمركب 11E (طيف رقم 9 ، '9)

إزاحة كميائية (δ ppm)	التعددية	ثابت التزاوج (*J*, Hz)	التكامل	التوزيع
7.89	ثنائي	8.7	2H	H-2' , H-6'
6.69	ثنائي	8.9	2H	H-3' , H-5'
6.65	أحادي		1H	H-3
6.55	أحادي		1H	H-6 أو H-8
3.68	أحادي		3H	$O-CH_3$ (6)

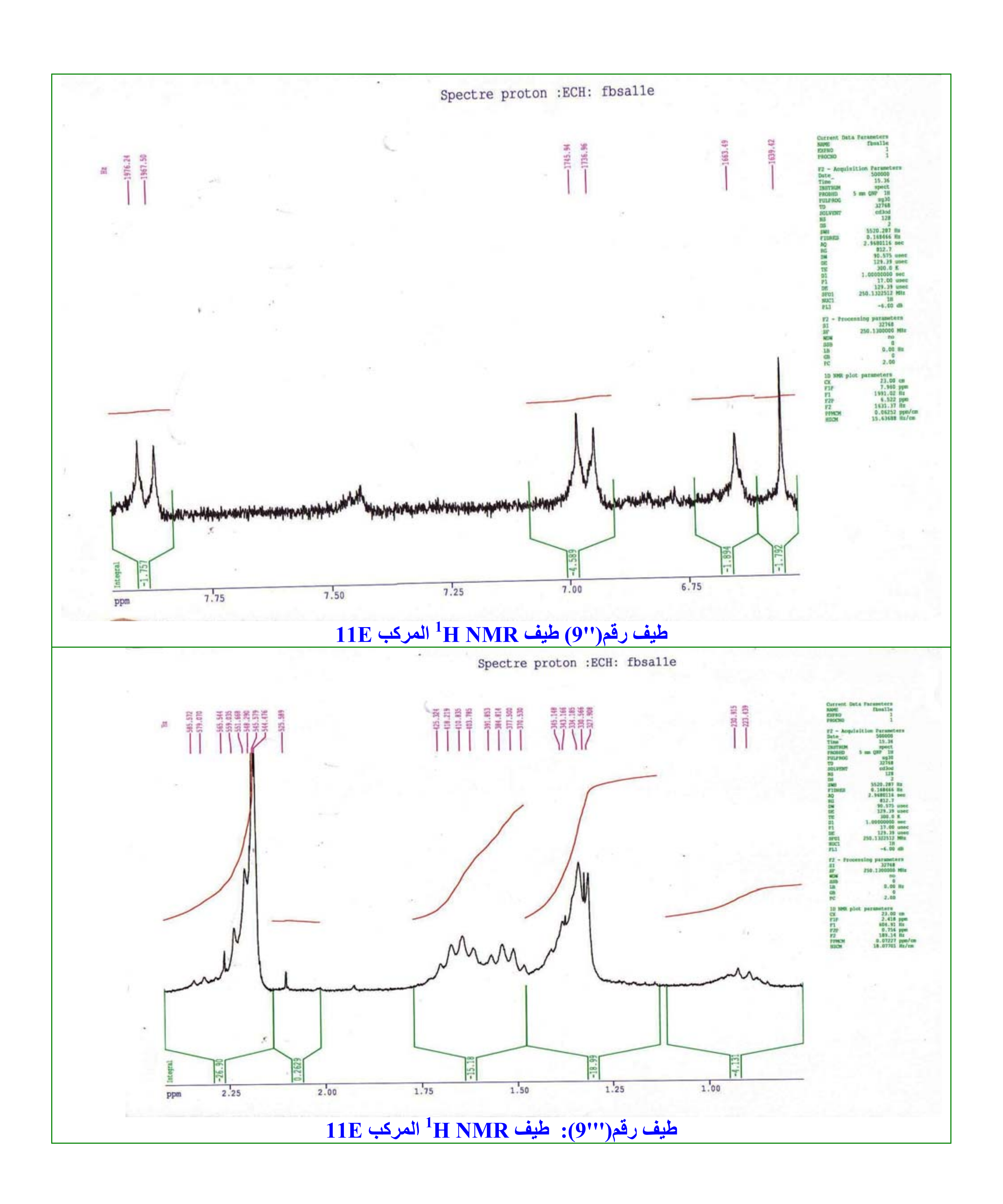
جدول (20.C): مطيافية امتصاص الأشعة فوق البنفسجية – المرئية للمركب 11E (طيف رقم 10).

الكواشف	الطول الموجي nm		
	عصابة II	نتوءات أخرى	عصابة I
MeOH	271		336
NaOH	279	331	399
$AlCl_3$	277	350 , 302	387
HCl / $AlCl_3$	279	347 , 301	382
NaOAc	278		390
H_3BO_3/NaOAc	276		362
NaOH	مستقر بعد 5دقائق		



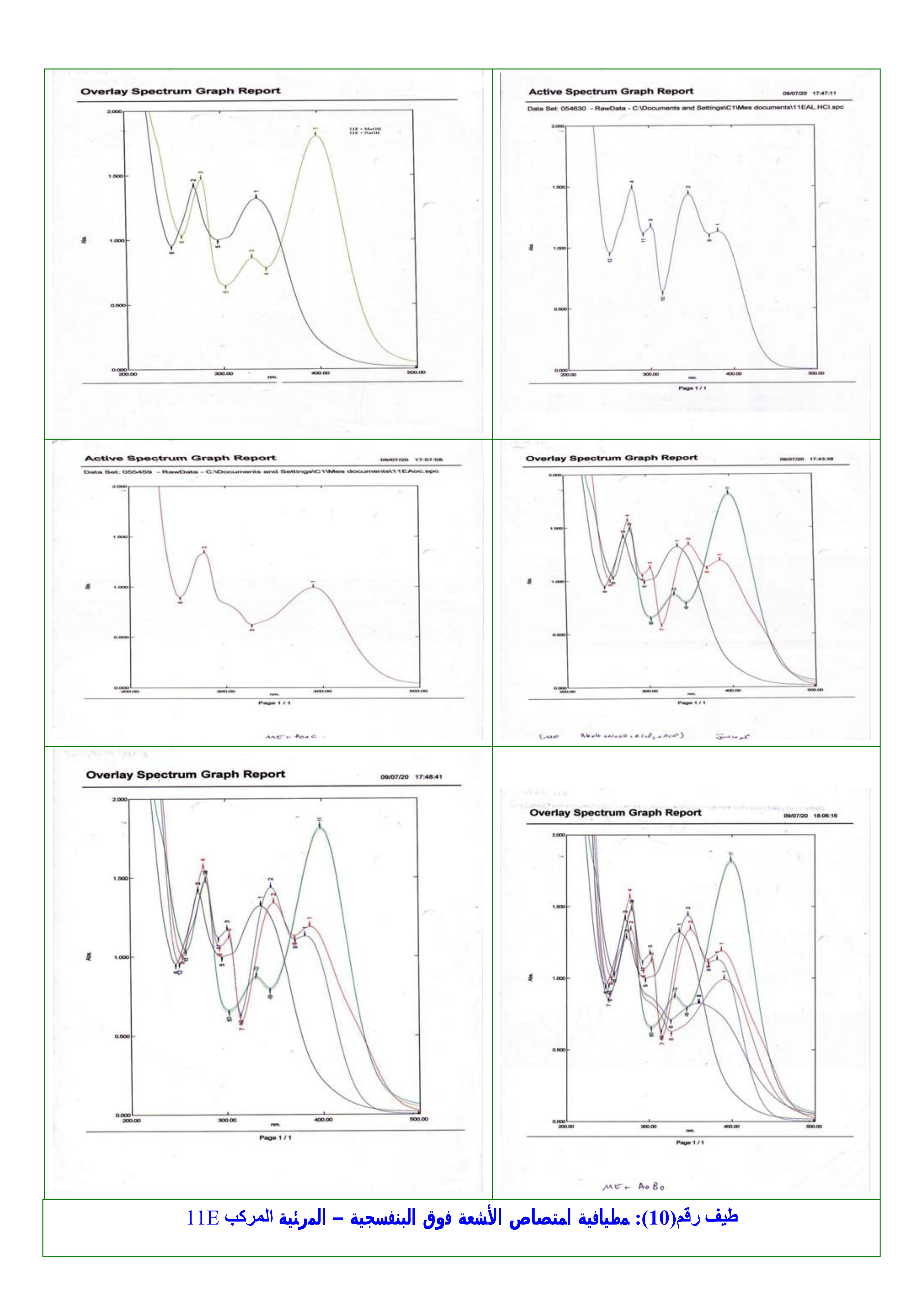
طيف رقم(9): طيف ^{1}H NMR المركب 11E

طيف رقم('9): طيف ^{1}H NMR المركب 11E



طيف رقم(''9) طيف ^{1}H NMR المركب 11E

طيف رقم('''9): طيف ^{1}H NMR المركب 11E



طيف رقم(10): مطيافية امتصاص الأشعة فوق البنفسجية – المرئية المركب 11E

التعليل :

تدلي مطيافية الرنين المغناطيسي النووي للبروتون ^{1}H NMR (طيف رقم9 ، 9´) أن الثنائيتين اللتين توجدان عند δ =7.85 ppm و δ =6.93 ppm تعبر عن وجود جملة من نـوع AB مضـاعفة وتشير إلى البروتونين ´H-2 و´H-6 والبروتونين ´H-3 و´H-5 على التوالي. يظهر هذا المجال إشارتين أحاديتين بتكامل 1H عند δ = 6.65 ppm و δ = 6.55 ppm تنسب إلى كـل مـن H-3 وH-6 أوH-8 على التوالي. كما يبين أيضا وجود إشارة أحادية بتكامـل 3H عنـد 3.68 ppm = δ وهـي خاصـة بمجموعة ميتوكسيلية. تقود هذه المعطيات الى الصيغة الجزئية التالية:

ولتحديد طبيعة كل من R_1، R_2، R_3، R_4 نلجأ إلى دراسة سلسلة أطياف امتصاص الأشعة فـوق البنفسجية، حيث يتبين من الطيف (رقم 10) المسجل بالميثـانول العصـابة I عنـد λ_{max} = 336 nm المؤكدة لصيغة الفلافون (وجودH بالموضع 3) خاصة وأن اللون الاسشتعاعي بنفسجي.
وتشير اضافة الـ NaOH إلى المحلول الميتانولي الى وجود OH حر بالموضع '4 نتيجة حدوث إزاحة باثوكرومية لهذه العصابة ($\Delta\lambda$ = 63 nm) مع ارتفاع بالشدة الضوئية. ومنه يستنتج بأن H = R1. كما يبين هذا الطيف عصابة جديدة عند 331 nm ويدل هذا على وجود OH حر بالموضع 7 فيستنتج من ذلك ايضا أن R_4 = H. إن إضافة $AlCl_3$ وHCl يسجل طيفا ذو إزاحـة باتوكروميـة مقارنة بالطيف المسجل بالميتانول ($\Delta\lambda$ = 46 nm) وتعني بأن الموضع 5 يشغل بـ OH حـر وعـدم وجود مجموعة أكسيجينية بالموضع6 ، هذه المعطيات تسمح بالقول بـأن H = R2. ونظـرا لوجـود مجموعة ميتوكسيلية نستنتج أن R_3 = CH_3. وبما أن المجموعة الأوكسيجينية ليست بالموضع 6 فهذا يعني أنّها بالموضع8. تسمح هذه المعطيات بإدراج صيغة هذا المركب وهو :
Hispidulin. كل هذه المعطيات مدونة بالجداول (19.C ،20.C)

6.4.3 تحديد النسب العائلي للمركبات: 8C1 ، 8D1، E33 ، E43، 11A، 113، 11F

تم تحديد النسب العائلي للمركبات 8C1 ، 8D1، E33 ، E43، 11A، 113، 11F جزئيا إعتمادا على معطيات كل من [1]H NMR و مطيافية الـ UV و قد إقتصرنا على عرض نتائج هذه الأخيرة. يمكن توظيف هذه النتائج في تفسير الفعالية البيولوجية.

جدول (21.C): مطيافية امتصاص الأشعة فوق البنفسجية – المرئية المركب 8C1

الكواشف	الطول الموجي nm		
	عصابة II	نتوءات أخرى	عصابة I
MeOH	270		350
NaOH	279	320	394
$AlCl_3$	274	304 ، 349	376
$AlCl_3$/HCl	274	304	351
NaOAc	277	305	386
NaOAc /H_3BO_3	271		351
NaOH	مستقر بعد 5 دقائق		

جدول (22.C): مطيافية امتصاص الأشعة فوق البنفسجية – المرئية المركب 8D1

الكواشف	الطول الموجي nm		
	عصابة II	نتوءات أخرى	عصابة I
MeOH	253		357
NaOH	272		405 زيادة في الشدة الضوئية
$AlCl_3$	258		366
$AlCl_3$/HCl	256	268	352
NaOAc	258		381
NaOAc /H_3BO_3	258		371
NaOH	مستقر بعد 5 دقائق		

جدول (23.C): مطيافية امتصاص الأشعة فوق البنفسجية – المرئية المركب E43

الكواشف	الطول الموجي nm		
	عصابة II	نتوءات أخرى	عصابة I
MeOH	268		329
NaOH	271		387 زيادة في الشدة الضوئية
$AlCl_3$	274	351	414
$AlCl_3/HCl$	275	349	388
NaOAc	269	324	399
$NaOAc/H_3BO_3$	269	327	404
NaOH	مستقر بعد 5 دقائق		

جدول (24.C): مطيافية امتصاص الأشعة فوق البنفسجية – المرئية المركب 113

الكواشف	الطول الموجي nm		
	عصابة II	نتوءات أخرى	عصابة I
MeOH	268		328
NaOH	274		388
$AlCl_3$	274	322	427
$AlCl_3/HCl$	273	319	355
NaOAc	273	319	355
$NaOAc/H_3BO_3$	270	276	398
NaOH	مستقر بعد 5 دقائق		

جدول (25.C): مطيافية امتصاص الأشعة فوق البنفسجية – المرئية المركب11F

الكواشف	الطول الموجي nm		
	عصابة II	نتوءات أخرى	عصابة I
MeOH	274		329
NaOH	382	332	400
$AlCl_3$	278	304	346
$AlCl_3/HCl$	279	304	346
NaOAc	282		379
$NaOAc/H_3BO_3$	279		349
NaOH	مستقر بعد 5 دقائق		

الخلاصة

لقد أنصب الإهتمام بهذه الدراسة على نبتتـين صـحراويتين همـا *Chrysanthemum fuscatum* و*Colocynthis vulgartis* لإعتبارهما من أهم النباتات الصحروية حيث وقع الإختيار على *C. fuscatum* من إحدى ضيات توقورت ضمن مخطط التنقيب وإجراء مسح نباتي للنباتات الطبية الصحروية ضمن مشروع أبحاث الصحراء: "مركز التقنيات و الأبحاث العلمية بالمنـاطق الجافـة (CRSTRA).وقـد أستبعدت *C. vulgaris* و بالأحرى طورها البيتانولي من الدراسة لعدم إستجابتها للفعاليـة البيولوجيـة المناطـة بهـذه الدراسـة حسـب مـا أدلتـه الإختبـارات البيولوجيـة، بينمـا اخضـعت *C. fuscatum* خاصة الطور البيتانولي إلى الدراسة التحليلية لم أبداه هـذا المسـتخاص مـن فعاليـة بيولوجية بإختبارات *in vitro* و*in vivo* .

ولقد أدلت الفحوص التحليلية التمهيدية بمدى غنى هذه المستخاص البيتانولي بالفلافونيدات حسـب ما عكسته الخريطة الفلافونيدية, وأدى الفحص الكروماتوغرافي لـ ـ 12.5غـرام مـن المسـتخاص البيتانولي بإستعمال الأميد كطور ثابت عبر الجمل 4/3/3 ، 13/3/3/1 ، 18/1/1 إلى كسور عدة تم تجميعها ثم الإنتقاء منها للكسور F2 ، F8 ، F11 و التي مررت بدورها بسلسلة من عمليـات الفصـل بإستعمال (ك، ط، ر) التحضيرية من متعدد الأميد إعتمادا على أنظمة مختلفة مع إستدعاء أحيانا للتنقية على عمود الـSephadex.

وقد تم الإعتماد للتعريف على البنى الكيميائية للمركبات على أساس السلوك الكروماتوغرافي ومطيافية الأشعة UV ومطيافية ^{1}H NMR و^{13}C MNR و مطيافية الكتلة. وقد أسفرت هذه الدراسة عن 17 مركبا. عرف بنويا 5 مركبات بينما حددت عائلات بعض المركبات السبعة لينتمي أحدها إلى عائلة الـisoflavone وأثنين منها إلى عائلة الـفلافونول بينما ينتمي إلى عائلة الفلافون باقي المركبات.

المراجع

Attaway, J. A . (1994). Citrus juice flavonoids with anticarcinogenic and antitumor properties in "food phytochemical" for cancer prevention. I. Fruits and vegetales (M. T Huang, T. Osawa, C .T . Ho, and R.T . Rosen, ed s) , A CS Symposium Series 546, pp , 240-248. American Chemical Society, Washington , JC.
Audier, H. (1996). Etudes des composées flavoniques par spectrometrie de masse, Bull. Soc. Chim. 9, 28792-2899.
Berthier, A. (1972). La chromatographie et ses applications Dunod , Paris
Bronner, W.E.; Beecher, G.R. (1995). Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grape fruit juice concentrates. J. Chromatogr. 705, 247-256.
Bruneton, J. (1986). Drogues and flavonoids . Elements de phytochimie et de pharmacognosie P 156-170.
Bruneton, (1993). Pharmacgynosie phytochmie des plantes medicinales P. 272-279 technique et documenttions Lavoisier.
Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie phytochimie plantes medicinales 2ème édition Cedev Paris
Cai, H.; Raynaud, D.; Stewartd,,W.P.; Gescher, A.J. (2006). A simple HPLC method for the determination of apigenin in mousse tissues. Biomed. Chromathogr. PMID: 16506281[PubMed].
Chopin, J. (1966). Actualité de phytochimie fondamentale, 119 .2ème serie, editeur, Masson, Paris.
Cody, U.; Middleton, E; Harbone, J. B. (1986). Plant flavonoids in biology and medecine, biochemical, pharma cological and structure activity relation ships .Allan R. Liss, New york.
Combier, M.; Jay, B, B.; Voivin, P. Lebreton (1974). Influence des 6 (ou) 8 substitutions sur le comportement spectrophotometrique et chromatographiques des flavonoles.
Daragsted, L.O.; Stube, M; Leth (1997). Dietary levels of plant phenols and other non nutritive components: could they prevent cancer, Eur. Cancer Prev. 6, 522-528.
Ellio Medleton, J. (1984). The flavonoids. Trends Pharmacol Sci 5, 335-338.
Geissman, T. (1955). In modern methods of plant nalysis. Vol III, K. Paech et V. Tracey P:133
Grise bach, (1965). In chemistry and biochemistry of plant pigments. T. W. Good Win Editeur Academic Press. New York.
Haborne, J. B. (1977). In "Biology and Chemistry of Compositae" . Heywood, V. H.
Harborne,J. B .(1964). Biochemistry of phenolic compounds, Academic Press, New york.
Harbrine, J. B..; Mabry, H.; Mabry, T.J. (1975). The flavonoids .Time I, Tome II, Edition Chapman and Hall, London.
Harbone, J.B.; Baxter, H. (1999). The hand book of natural flavonoids , Willey , Chapman and Hall, London.
Harborne, J. B. (1967). Comparative biochemistry of the flavonoids. Editeur Academic Press London.
Harborne, J. B. (1952). In chemistry and biochemistry of plants pigments. T. W. Good Win Editeur Academic Press, New York. P: 220.
Harborne, J.B.; Mrbry, T. J. (1982). The flavonoids advance in reaserch. Edition Chapman and Hall, London.
Harborne; J. B. (1988). The flavonoids. Edition Champman and Hall.
Hermann, K . (1976). Flavonols and flavones in food plants: A review. J Food Technol .11, 433-448.
Hertog, M.G.L.; Feskens, E.J; Hollman, P.C.H.; katan, M.B.; kromhout, D. (1993). Dietary, antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease. Lancet 342, 1007-1011.
Jurd, L.; Horowitz, L.; (1962). Spectral properties of flavonoid compounds. In Gers sman, T. T., the chemistry of the flavonoids. Editeur Pergaman Press Oxford. P.107
Jurd, U. (1962). In the chemistry of flavonoids compounds, T, A. Geissman Editeur Pergaman Press. New York.
Kuhno, J. (1976). The flovonoids: A class of semi essential food components; their role in human nutution. World Rev. Nutr. Dict 24, 117-19.
Lee, G.S.; Kim, H.J.; Lee, Y.S.G (2003). A new anti-HIV flavonoid glucuronide from *Chrysanthemum morifolium*. Planta Med. 69(9), 859-861.
Loiseleur, J. (1963). Techniques de laboratoire. Chimie, physique, Chimie biologique Tome I, Fascicule I ; Editeurs Masson et Cie.
Mabry, J. (1969). In perspectives in phytochemisti plyxachemes try , Editeur J.B Harborne et T.Swain P.20 Academic Press London.
Mabry, J.; Markham, K. R; Thomas, M.Z.; (1970). The systematic identification of flavonoids Editeur Springer Verlag Berlin.
Markham, K.R. (1982).Techniques of flavonoids identification. Academic Press, London
Middleton , E.J. (1996). In biological properties of plant flavonoids: an overview.
Intel. Pharmcognosy.
Price, K.R.; Rhodes, M. J. C. (1997). Analysis of the major flavonol glygosides present in four varieties of anion (*Allium cepa*) and changes in composition resulting from autolysis. J. Sci. Agric, 74, 331-339.
Quezel, P.; Santa, S. (1963). Nouvelle flore de L'Algerie et des régions désertiques méridionales. U.2 P, 902,

CNRS Paris.
Ribireau- Gayon,(1968). les composés phenoliques des vegetaux .Edition Dunod Paris.
Rice–Evans, C.A.; Millar, N.J.; Paganga (1996). Structure antioxidant activity relation-ships of flavonoids and phenolic acids. Free. Radic. Biol. Med. 20, 933-956.
Robinson, R. (1936). Nature, 137, 1172 P: 203.
Sanni, C.; Sauvin, H. (1952). Les couleurs des fleurs et des fruits, Anthocyannes et flavones.
Editeurs du museum, Paris. P : 220.
Stavric; Matula, T.I. (1992). Flavonoids in food; Their significance for nutrition and health, p 274-294.
Trease, G.E. (1966). Textbook of Pharmacognozy Bailliere, Tindall and Cassell. London.



الدراسات المرجعية

1 الجهد الرودوسكي

تعتبر الجزئية الأوكسيجينية ذات الخاصية المؤكسدة عنصرا مهما بالحياة، ويولّد الإختزال غيـر الكامل للأكسيجين إلى ماء الأنماط الأكسوجينية النشطة (ROS): الأكسـيجين المنفـرد $O°^{-}_2$، H_2O_2، NO_2. إن الإنتاج المستمر لهذه الجذور النشطة يؤمن العديد من الوظائف الفيزيولوجية، فهي منبهـات للعديد مـن مضـادات الأكسـدة مثـل الـ glutathione، الpyridin، النكليوتيـدات، retinoic acid وtocopherol حيث تنتج العضوية قدرا من الـ ROS عبر العديد من الأنظمة منهـا سلاسـل التـنفس الميتوكندري (Daniel و آخرون، 2005) وكذا إختزال الO₂ عبرال oxidase الخلـوي، peroxidase، mono وdioxygenases لتعتمد هذه الجذور كإشارات فيزيولوجية (cytokine، عوامل النمو) في تأمين التواصل الخلوي (Allen وBaling، 1989؛ Valko وآخرون، 2006).

1.1 الدورة الردوكسية

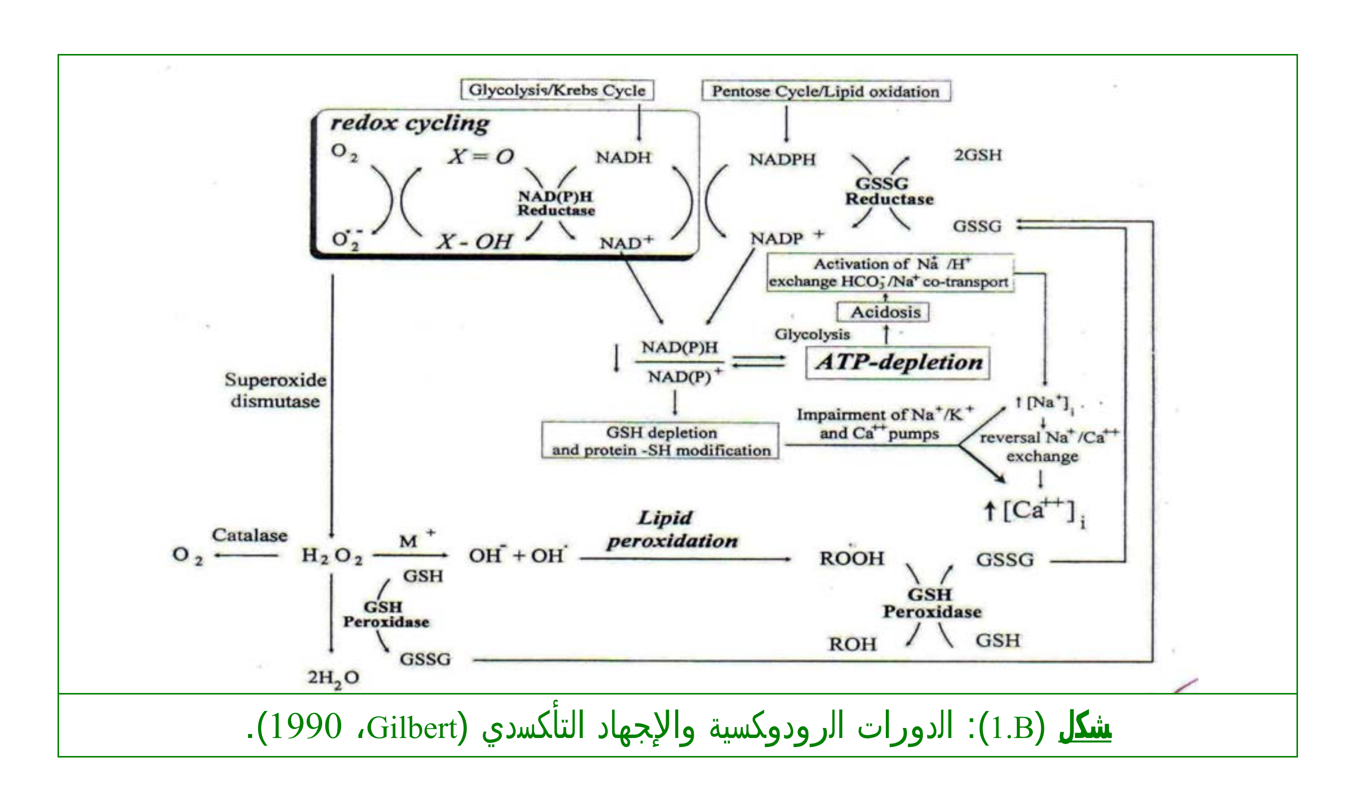
تعتبر الROS الميتوكندري والسيتوزولي أحد محددات الجهد الرودوسكي، إذ تتـدخل الأنزيمـات الإختزالية الداخل خلويـة مثـل الNADH-cytochrome، aldehyde reductase، والketone reductase. ومن خلال أكسدة بعض المركبات الداخلية مثل الـ dopamine وadrenaline يولد الجـذر $O_2^{°-}$ مـن خلال الأكسدة عبر الفلافين مثل CYP reductase (Halliwell وGutteridge، 1989) ليولّد هذا التفاعل جزئية semiquinone، وتتفاعل هذه الأخيرة بدورها مع O_2 لإنتاج جزيئة O_2^{-} المنتجة للـ H_2O_2 فـي وجود الماء. وبهذا التسلسل التفاعلي تؤكسد كلية جزيئة الـ Quinone (Beyer، 1990) وعبر تفاعلات Haber-weiss وبحضور الأيونات المعدنية يولد الـ$OH°$ أو عبر تفاعلات الـFenton يولـد الـ $O_2^{°-}$ والذي يتغلغل بكفاءة فائقة داخل خلويا (Gutteridge،1995)، ويتدخل العديد من الأنزيمات تتم فعاليات الأكسدة اللبيدية وإنتاج العديد من البيروكسيدات اللبيدية، الألدهيدات الدهنيـة (hexanal)، مالونالدهيـد السلاسل القصيرة الألكالية مثل الEthane والBentane. ويحكم مستوى التفكـك البيروكسـيد اللبيـدي الحضور الحديدي والروابط الهيمية الحرة (Harber وWeiss، 1934). إن التعرض الطارئ للظروف الخارجية عادة ما يخلّ بالجهد الرودوسكي لتتأرجح الكفة التأكسدية أو ما يعرف بفـرط إنتـاج الROS منعكسا على سـلوكيات شـاذة مثـل الcytotoxicity وال mutagene (Halliwell، 1994). فـاختلال هيموستازيا الرودوكس أو ما يعرف بالإجهاد التأكسدي إثر فرط تحررالROS، أو إثر اختلال الأنظمة المضادة للأكسدة، الناجم عن الإشعاعات UV وحالات الـHypoxie والحضور المفرط لـdioxygene وتنشط الجهاز المنـاعي و تنشـيط myeloperoxidase وتحـريض أنزيمـات الطـور الأول (CYP monooxygenase) والxenobiotics ينشط الإستقلاب التأكسدي مؤزما التسرب الالكتروني وفرط إنتاج

ROS. كما تحفز مشتقات الubiquinols السلاسل التنفسية أو الجزيئات الحاملة للمعـادن (Cu^{2+}, Fe^{2+}) إنتاج ال $O_2^{°-}$ (Halliwell و Gutteridge، 1986؛ Nevin وVijayammal، 2005).

وللحفاظ على التوازن الرودوكسي، عزز النّظام الردوكسي بمضادات أكسدة داخلية يلعـب مـن خلالها الجلوتاثيون المسؤول مباشرة عن هيموستازيا الرودوكس الداخل خلوي دورا معتبرا بمنع تراكم الROS، كما ويتدخل الcatalase المحول للـH_2O_2 إلى ماء وO_2 وكذا دوران الـ SOD المبعـد للـ $O_2^{°-}$منتجــا لـ H_2O_2، ويتــدخل GSH-px، quinone reductase وhemoxygenase وجزيئــات thioredoxine والفيتامينات السيتوزولية والغشائية كمنظّمات لهيموستازيا الرودوكس (Valko، وآخرون 2006).

2.1 الأنظمة الرودوكسية

إن الجهد الرودوكسي الداخل خلوي عادة ما يكون محصلة حالة الردوكس للثنائيات أكسدة إختزال، ويرتبط هذا الpH . ويعتبر الGSSG/GSH أهم المنظمات الردوكسية وكذا NADPH/NAD و(SH_2) Trxss/Trx (Ziegler، 1985). ولا يمكن عزل هذه الأنظمة عن بعضها البعض حيث يعتبر كلا من Trx وGSH الNADH مصدرا للمكافئات الإختزلية، ويحكم هذا الفضاء الرودكسي الخلوي لكل من الخلية والأنسجة نصف عمر قوة الثنائيات الردوكسية (Gilbert، 1990).



شكل (1.B): الدورات الرودوكسية والإجهاد التأكسدي (Gilbert، 1990).

1.2.1 النظام الجلوتاتيوني

يعتبر الجلوتاتيون منظما مفتاحيا بالطور الرودسكي لثيول السيستيئين البروتيني ويقدر الـ GSH الداخل خاوي المتموقع عادة بالسيتوزول بمقدار (1-11 mM)، إذ يخلق على هذا المستوى انطلاقا مـن L-glatamate (Kritin وVasagayam،2000) بتدخل أنزمي γ-glutamyl cysteine synthetase (γ-GCS) و glutathione synthetase (GS) (Williamson وآخرون، 1996)، وفضلا عن دوره المضاد للأكسدة وإزالة سمية الكتروفيلات الـ xenobiotics فهو معدل نقل إشارات التنظيم الردوكسي، مخـزن وناقـل للسيستيئين (Bray وTaylor، 1993)، منظم التوالد الخاوي، مخلّـق لـdeoxyribonucléolides، مـنظّم للاستجابة المناعية وإستقلاب الـLeukotreine والـProstaglandine (Okunoوآخرون، 1998).

يتدخل الـGSH بآليتين لمنع التأكسد عن طريق التفاعل الفوري مع الـROS وبشكل متـزامن مـع الـGPx، لا يلبث الـGSSG المنتج داخل خاويا من أن يختزل في وجود الـGR أو يحرر خـارج خاويـا ليعتبر تراكما لـGSSG عاملا محددا لمدى التحسس الخاوي للإجهاد التأكسدي. كما يتواجد كـل مـن الـGSH والـGSSG خارج خاويا بكميات محدودة، ويساهم الجلوتاثيون الخارج خاوي بـدوره فـي إزالة السمية وتعزيز الفعل المضاد للأكسدة، ويقل تركيزه عن تركيز الداخل خاوي بمقدار 100 إلـى 1000 مرة. تحتفظ النواة بالـGSH مستقلا عن السـيتوزول وهـذا لتـأمين البروتينـات الكبريتيـة الضرورية لـADN والتعبير الجيني (Arriago، 1999). وخلافا لـذلك فـإن جلوتـاثيون الشـبكة الأندوبلازمية يكون أكثر تأكسدا مقارنة بالسيتوزول وتتراوح النسـبة GSSG/GSH مـا بـين 1 : 3 (Griffith، 1999).

ينظم المحتوى الجلوتاثيوني توازن الـthiol-disuffides، كما يؤمن SH السيسـتئين الجلوتـاثيوني العديد من الوظائف الفيزيولوجية، وتعتبر ثيولات الشبكة الأندوبلازميـة: CoSH وcysteine إشـارات التواصل الرودوكسي ما بين الخاوي. كما يحكم GSH الداخل خاوي التعبيـر الجينـي *C-Jun* Onco protein و كذا عائلة البروتين *AP-1*، ويتوقف ارتباط الـ *apo-sp1* بالـ DNA على النسبة GSH/GSSG (Kritin وآخرون، 1999). ويتحسس الكالسيوم الداخل خاوي أيضا العوامل الثيوليـة، ولعل هذا ما يفسر استنفاذ مخازن الكالسيوم من خلال ترا كـم الـ GSSG (Nakamura وآخـرون، 1997). ينعكس إرتفاع معدل GSSG برفع أكسدة الثيولات البروتينية وظهور التشوهات البروتينيـة. وتتدخل مختزلات ثيولية مثل thioredoxin والـglutaredoxin والـprotein disulfde isomerase فـي تأمين مستويات الجلوتاثيون (Seen، وآخرون، 2006).

2.2.1 نظام Thioredoxin (Trx)

يعتبر الثيورودوكسين أحد أهم الأنظمة الردوكسية المنظمة للثيول الخلوي، وهو بروتين ذو علاقة مباشرة بالتنظيم الجيني من خلال التواسط بين عوامل الاستنساخ المتحسسة للردوكس مثل *AP-1* (Caskada وآخرون، 1996)، وللقيام بهذا الدور ينبغي أن يكون بصورته المختزلة التي يؤمّنها له thioredoxine reductase. يقل تركيزTrx بـ 100 إلى 1000 مما هو عليه الجلوتايتون (Cotgreave، 1998). وبعكس الجلوتاثيون الذي يشكل ثنائيات كبريتية ما بين جزيئية فإن الثيورودوكسين يشكل عادة ثنائيات كبريتية داخل جزيئية (May وآخرون، 1997).

يساهم الثيورودوكسين بدور المانح الهيدروجيني لـ Ribonucleotide reductase و methionine sulfoxide reductase وميسرا بذلك تحديد المحتوى الكبريتي الثنائي (Holmgreng Lundstrom، 1990) وينظم مباشرة الارتباط بين عوامل الاستنساخ مثل: B_2LFI، T FIIIc، NF-kB، وADN (Hill وTreismang، 1995) وبشكل غيرمباشر بالنسبة للبروتين *Ap-1* . كما ينشط اللمفاويات والFibroblast والخلايا الورمية ويرفع من معدل السيتوكينات مثل ومنبه لمضادات الأكسدة مستبعد لـH_2O_2 ومجدد للأسكوربات (Raja وآخرون،2007) الذي يحفّز إختزال الكسور الكبريتية S-S، ويوجد الـ Trx peroxidase كبروتين ستيوزولي والذي يحفّز تحول الهيدروبيروكسيدات وألكيلات الهيدروبيروكسيد إلى ماء وكحولاتها المقابلة ، ينشط مستقبلات glucucortides و-2 interlieukin Okuno وآخرون، 1993).

3.2.1 عوامل الاستنساخ و التحسس الرودوسكي

يلعب كل من GSSG reductase ، thioredoxin، thioredoxin reductase دورا مركزيا في التحسس الردوسكي. يحكم المجموع الكبريتي للبروتينات مدى غناها بالسستيئين إذ توجد بالخلية على صورة Thiol (-SH) ثنائيات الكبريت (PS-SP) أو جليكوكبريت (PS-SG) من خلال ارتباطها بالـ GSH، فالبروتينات ترتبط بـ GSH cysteine، homocysteine، cysteine γ-glutamyl لتظهر في صورة خليط كبريتي، وتتوقف dithilation هذه البروتينات على أنزيمات مثل: GSSG reductase، thioredoxin reductase، و disulfide oxido reductase (Bouton وآخرون، 1997).

فالتغيرات الثيولية للبروتين تتوقف على تغييرات الفضاء الردوكسي الخلوي لينعكس على مسارات نقل النبأ الخلوي، تخليق DNA وRNA، تخليق البروتين، التنشيط الأنزيمي، تنظيم الدورات الخلوية(Natanishi،2003). وتكون عوامل النسخ المتحسسة للجهد الردوكسي وظيفية وهي في صورتها المختزلة إذ يثبط نقل النبأ النووي في حضور0.5 mM من H_2O_2 كما يرفع المعدل العالي للثيولات معدل التكاثر الخلوي الورمي (Seen ، 1998). لقد أدلت بعض الدراسات أن الكفاءة

الردوكسية الداخل خلوية قد تعدل من نشاط عوامل الاستنساخ بعائلات *Ap-1* (Arriago، 1999) وNFkB و Ap2 (Sen وPacker،1996). وتتوقف درجة التحسس هذه على البنى البروتينية ومدى إمكانية هذه الأخيرة للاستجابة لفعاليات الفسفرة والجلكزة أو الأكسدة، وتحدد هذه الأخيرة كثيرا من وظيفة عوامل الستنساخ.

تملك الخلية بعض من جينـات الإنـذار *C-Jun, egr-1* (Choi وMoore، 1993) أو Gadd-153 خاصية إزالة السمية من خلال الاستجابة إلى الجهد الردوسكي (Hill وTreisman، 1995). وتغيرات الرودوكس يتحسسها مجاميع الثيول والتي تؤمن مايلي:

1. حضورمجاميع الثيول بمجال ارتباط الـ ADN بعامل الاستنساخ يؤمن التعارف بمواقع التداخلات الالكتروستاتيكية خاصة منها الروابط الهيدروجينية مع قواعد الـ ADN لإعطاء جسور ثنائية الكبريت ما بين أو داخل الجزيئات (Walker وآخرون، 1993).
2. تحديد الهيكلة الثلاثية الأبعاد وفقا لهذه الجسور الكبريتية.
3. ينسق السيستئين ما بين الكاتيون المعدني خاصة Zn^{++} (مجال الارتباط المعروف بأصابع الزنك) ليتوافق مع أكبر مواقع الـ ADN .

إن أكسدة السيستيئين تنعكس على سلوك عامل الاستنساخ كما يخل التشكل الطارئ للجسر الكبريتي بالوظيفة البروتينية. ومظاهر أكسدة الـ cysteine تظهر في صورة sulfenique (S-OH) أو sulfinique ($-SO_2H$) و sulfonique ($-SO_3H$) (Sies وAkerboon، 1999).إن السيستئين المشكّل لمنطقة الارتباط الفعالة بـ DNA يخلّ اثر أكسدة ارتباط عامل الاستنساخ بالسلاسل المستهدفة *AP-1* و*NF-1* (Aizenman، وآخرون 1990)، فقد وجد أن العامل النووي *NF-kB* يعتمد على 2 سيستئين الحساس للردوكس على مستوى روابط ADN التي ينبغي أن تكون بصورة مختزلة، ويؤمن إختزالها بفعل Trx أو بروتين نوعي يعرف بـredox factor-1 (*Ref-1*)، يبدي هذا العامل استجابة فورية للاجهاد التأكسدي (قلة GSH و زيادة H_2O_2) (Seen، 1998). ويتشكل المعقد activator protein1 (*Ap-1*)من الثنائي *Jun-Jun* أو *Fos-Jun* الذي يستجيب بدوره لمختلف مؤشرات الإجهاد التأكسدي منشطا الجينات الطلائعية الإنذارية (Okuno وآخرون، 1993)، وينشطه كل من الإشعاع الفوق بنفسجي وكذا تراكم الـ H_2O_2 . يتموقع السيستئين 252 بالبروتين *Jun* وهو موقع الحساسية والاستجابة (Gonzalez وآخرون، 1999) ويسهل العامل *Ref-1 in vivo* إختزال السيستئين(Nakamura وآخرون، 1997). ومن الطلائع الجينية المتحسسة لـ H_2O_2 عامل النسخ *Sp1* الذي يضم ثلاث أصابع من الزنك يثبط ارتباط *Sp1* بالـ ADN اثر حالة الإجهاد(Shakelford ، 2000).

ولقد وجد بأن فسفرة بروتين مشتقات Ca_2^{++} والفعالية البروتستيكية للبروتين تعبر عن أكبر إختلال في إشارات الاستنساخ، ولقد اقترح phosphate tyrozine كأحد أهم منظمات الجهد الردوكسي لحساسـيته الفائقة للأكسدة (Matthews وآخرون، 1992).

3.1 النظام الميتوكوندري والجهد الرودوكسي

تعتبر الميتوكوندريا مركزا مهما لمختلف فعاليات الأكسدة بالخلية، وتؤمن العديد مـن المعقـدات الأنزيمية المتوضعة بالغشاء الداخلي النقل الإلكتروني من مـواد السلاسـل التنفسـية إلـى الجزئيـة الأكسجينية (Ligeret وآخرون، 2004) مولدا حركية البروتون من الحشوة الميتوكوندرية إلى الفضاء المابين غشائي لتستعمل الطاقة الناتجة من هذا التدرج البروتوني في تخليق الـATP وكـذا تفـاعلات استهلاك الطاقة (Kumat وآخرون، 2000). يطلق على أول صور الطاقة المولّدة بالميتوكوندريا اسـم الميل البروتوني الكهروكيميائي ($\Delta_{\mu}\tilde{H}$)، ويؤمن توليدها معقدات السلسلة التنفسية خاصة بنظام الأكسدة الفوسفورية حيث يعتبر الفلافين مونونكليبوتيد (FMN) الحامل الإلكترونـي لهـذا المعقـد الأنزيمـي والفلافين أدنين داي نكليوتيد (FAD) وكذا الـubiquinone وكل مـن الهـيم والنحـاس المـرتبطين بالبروتون (Koishunov وآخرون، 1997). تنطلق الأكسدة بفضل أنزيمات dehydrogenase مستخدمة الطاقة المحررة من اختزال الـNAD^{+} والـubiquinones بالغشاء الداخلي لتؤكسد بعدئـذ كـل مـن الـNADH والـubiquinols بتدخل المعقد I (NADH ubiquinone reductase) (Ligeret وآخـرون، 2004)، وتستخدم الطاقة المولدة في اختزال جزئية الـubiquinone وتوليـد ($\Delta_{\mu}\tilde{M}$). ويشـكل هـذا مدخلا رئيسيا في تصـريف الإلكترونـات باتجـاه المسـتقبل الإلكترونـي النهـائي (O_2) (Kumat وVasagayam، 2000). بينما يعتبر الـubiquinol cytochrome reductase المعقـد II (bc) المـدخل الثاني بالسلسلة التنفسية ويقوم بأكسدة الـubiquinol المختزل وتوليد ($\Delta_{\mu}\tilde{H}$) وتحرير السـيتوكروم C كبروتون متحرك في الوجهة السيتوزولية للغشاء الميتوكونـدري البـاطني(Sailaja وSetty، 2006)، ويقوم بدور الحامل الإلكتروني بين كل من المعقد الثالث والرابع، (Miro وآخرون، 1998). ويتـدخل cytochrome oxidase باختزال الأكسيجين الجزئي إلى ماء مولدا الـ ـ($\Delta_{\mu}\tilde{H}$) (Di Lisa وآخـرون، 1998). ويتزاوج كل من الضخ البروتوني والتدفق الالكتروني، ويحكم الـ($\Delta_{\mu}\tilde{H}$) المولّد كـل مـن الجهد الغشائي الكهربي والتدرج الحمضي (pH).

تتعالق التفاعلات الرودوكسية بالنقل البروتوني عند المعقدات I، II، IV، ويخلّق الـATP انطلاقا من الـADP والفوسفات اللاعضوي بفضـل المعقـد V (ATP synthetase) (Kumat وVasagayam، 1999). وعند الحاجة إلى مزيد من الطاقة يعاد إدراج البروتونات إلى الحشـوة (Emaus وآخـرون، 1988) كما يستغل الجهد الغشائي الميتوكوندري في النقل الأيوني ونقل المستقلبات من والى العضيات ويتراوح المجال الفيزيولوجي للجهد الغشائي من 120 إلى 220 mV (Skulachev، 1998).

1.3.1 الميتوكوندريا وتوليد الـROS

تعتبر الميتوكوندريا أحد أهم مصادر الـROS إذ يولد الـ$O_2^{°-}$ أولا ليتحول بعد ئـد إلـىH_2O_2 بتدخل الـSOD (Prostova وآخرون 2002). ولقد تم نسب مصادر الـ$O_2^{°-}$ الميتوكوندري حديثا إلـى الجذر ubisemiquinone° (QH°) الذي يتشكل عند المعقد الثالث III (Q°) باتجـاه الفضـاء المـابين غشائي(Maria وآخرون،2005). كما قد يولّد قدرطفيف من هذا الجذر إلى الحشوة عبرهذه المواقـع. بينما ترتئي دراسات أخرى حديثة (Sailaja وSetty، 2006) إلى اعتبارأن المعقد I هو أكبر مصـادر جذر الـ$O_2^{°-}$ إلاّ أن الموقع المحدد لهذا الجذر يبقى مجهولا. كما أعتبرت أن مختلف الـFe-s مواقـع روابط الـubiquionol مولدات مهمة لـ ROS. يقود الجهد الردوكسي للسلاسل التنفسية إلى توليدROS (Skulachev، 1998). لقد أدلى (Quan وآخرون 2006) بـأن الـ ـ $O_2^{°-}$ ينشـط مباشـرة التسـرب الهيدروجيني عبر مسارات UCPs، كما يمكن للسيتوكروم C والذي يعتبر أحد أهم مضادات الأكسـدة أن يمرر الالكترونات إلى الـ cytochrome oxidase لقدرته الفائقة على التقاط جذور الـ$O_2^{°-}$ والتجدد الدوري.

تعرف مثبطات تخليق الـATP بمثبطات تزاوج الأكسدة الفوسفورية، ومختلف موقفات الاقتـران عبـارة عـن أحمـاض ضـعيفة هيدروفوبيـة تمـلـك وظـائف protonophore (kowaltwoski وآخرون،2001). ويعرف الـrotenone أحد المركبات الأيزووفلافونيدية المستخرج مـن البقوليـات كأحد منظمات توليد الـROS بالمعقد I حيث يثبطها بمايكافئ (IC_{50} = 0. 7 nM/mg protein) (Rustin وآخرون،1994). أمّاالـantamycin فهي خاصة بالمعقد III بينما يكون الـNO° خاص بالمعقـد IV (Crompton، 1999).

لقد وجد أن هناك تأثيرات متبادلة بين التسرب البروتونيH^+ وتوليد الـROS واعتبر اللاإقتـران الميتوكوندري كإحدى الاستراتيجيات الوقائية خاصة بخلايا القلب والدماغ تحـت ظـروف الإجهـاد التأكسدي خاصة حالات داء السكري (Miro وآخرون، 1998). كما يمكن للأكسدة الليبيدية بدورها من رفع معدل التسرب البروتوني وخفض المقاومة الكهربية، وترفع الـ ـ peroxynitrite (ONOO°) مـن معدل التسرب بالعزلات القلبية والدماغية. ينشط الـ$O_2^{°-}$ مباشرة التسرب البروتوني الـذي يتواسـطه الـUCPs ويختزل مباشرة السيتوكروم C (Zorati وSyabo،1995). وقد حددت علاقة ارتباط فوريـة بين التسرب البروتوني والأكسدة الليبيدية، إذ أن الدهون غيـر المشـبعة بإمكانهـا أن تخـل بنشـاط الـUCPs والبروتينات الغشائية الأخرى منعكسة بذلك على السـيولة الغشـائية (Skhuldtوآخـرون، 2004). كما أن البروكسيدات الليبيدية أثبتت بشكل جلي مدى تثبيطها للتنفس الميتوكنـدري. وبشـكل متناوب فإن الـROS ينشط التسرب البروتيني(H^+) إذ يقترح Diwan (2000) بأن الـ ـ$O_2^{°-}$ يمكنـه أن يتحول بالفضاء الحامضي المابين غشائي إلى$HO_2^{°}$ الذي يتغلغل عبر الغشاء الميتوكنـدري البـاطني

ويفقد هذه الصورة البروتونية بالحشوة القاعدية. ويسلك الـ $HO_2^{°}$ مسالك الـ protonophore اللامقترن، ثم يعاد تفاعل الـ $HO_2^{°}$ والـ $O_2^{°-}$ للإنتاج الفوري لـ H_2O_2 (Crompton، 1999). ويظهران انخفـاض معدلات الـ SOD والـ GPx إثر الإجهاد التأكسدي يرفـع معـدلات اللاإقتـران (Daniel وآخـرون، 2005). ينجم عن تثبيط التنفس الميتوكوندي التحلل الخلوي الذي يجسده الإلتهاب الكبدي واللاإقتـران الفوسفوري وانفتاح الثغور PTP الذي يعكسه تضخم بالحشوة الميتوكونرية إثرالتمزق الغشائي وتحرر السيتوكروم C (Chie وآخرون،2004) حيث يسبب السيتوكروم السـيتوزولي تنشـيط الـ caspase ـ والموت المبرمج وهذا تبديه بعض المستقلبات الدوائية التـي تـدمر الـ ADN ـ وتـرتبط تسـاهميا بالأنزيمات وتستنفذ الـ GSH وتؤكسد الثيولات البروتينية وتسبب ظهور الجسور ثنائية الكبريت بالثغر الميتوكوندري مما ينعكس بالموت المبرمج.

4.1 النشاط الميكروزومي والجهد الرودوكسي

دورات السيتوكروم CYP450

تتموقع معظم أنزيمات الميتابوليزم الدوائي بالثنائية الليبيدية الغشائية للشبكة الأندوبلازمية وهـي ما يعرف بالميكروزومات والتي تضم كل من CYP450 وNADPH-CYP450 وهو عبارة عن فلافـين يضم أنزيم الفلافوبروتين الذي يتشكل من 1 M من فلافين أدنين نكليوتيد (FAD) و1 Mg مـن فلافـين مونوتكليوتيد (FMN) لكل مول من apoprotein، و تنقل الإلكترونات عبر هذه الفلافوبروتينـات مـن NADPH إلى السيتوكروم (Lee، 1995). تشير الكثير من الأبحاث إلى وجـود صـور شـتى مـن الأنزيمات السيتوكرومية، وهي من أرقى عائلات الhemoproteins، تتمتع بنظام أكسدة وقد قسمت إلى عائلات وتحت عائلات وفقا للتتابع الأمينـي (Allan وConney، 2003). و لعـل أهـم التفـاعلات التنشيطية المقترحة لأنزيم CYP450-monooxygenase هي مدى ارتبـاط مـادة التفاعـل بالصـورة المؤكسدة لـ CYP450 (Fe^{3+}) لإعطاء معقد أنزيمي يختزل إلى حديـدوز بفضـل أنـزيم NADPH-cytochrome reductase ثم يرتبط الأكسجين الجوي بحديدوز الـ CYP450 لإعطـاء معقـد ثنـائي الأكسجين ويتم نقل إلكترون ثان إثر تدخل السيتوكروم b_5، ثم تنفصل الرابطة الزوجية O_2-O_2 مع أخذ 2 بروتون و توليد $O_2^{°-}$ (الجذور النشطة الأوكسجينية) ويسمح تغلغل الـ O_2 بمادة التفاعـل بـإنتزاع الهيدروجين من مادة التفاعل مع إنتاج هيدروكسيل وجذر كاربوني (Roman وآخرون، 2002). قـد يكون هذا التفاعل عكوسا أو غير عكوس (Sapone وآخرون، 2003) ويخضع التنشيط العكسي لتدخل الحلقات heterocycles النتروجينية المتضـمنة للـ ـ imidazole، quinidines، pyridine وellipticines وتتم هذه التفاعلات من خلال الأقطاب الكارهة للماء بين نصف بروتين CYP450 (Usia وآخـرون، 2006).

1.4.1 الحث السيتوكرومي

يسلك العديد من الأدوية مسلكا نوعيا في التحفيز السـيتوكرومي، إذ يعتبـر الـ phenobarbitol محفزا لكل من CYP2B وعـائلات A3، ويعتبـر الـ rifampicin محفـزا نوعيـا لـ CYP3A وعائلاتCYP2 ، ومحفزا نوعيا لعائلةCYP1A1 والـethanol محفزا نوعيا لـ CYP2E1، ويعتبـر الـINH محفزا للـ CYP2E1 ويتوقف هذا على التركيز (Pan وآخـرون، 2002). يتوقـف التنشـيط السيتوكرومي الميتابوليزمي على معادلة Hill أو ما يعرف بمعطيات الحركة السيجمويدية الذاتيـة، إذ يعبر معاملHill على عدد ومواقع الربط وقوة الارتباط (Pachaikanin وآخرون، 2003) كمـا هـو الحال مع الـaflatoxin من خلال التحفيز السيتوكرومي CYP3A4. وأهم ميكانيزمات التنشيط تخضع لفعل النسخ كما هو الحال مع rifampicin وglucocorticoides وبعض المضـادات الحيويـة (Periti وآخرون، 1989)، (Franklin، 1991)، يكون التحفيز السيتوكرومي نشطا على مستوى النسخ برفـع معدل mRNA.

1.1.4.1 السيتوكرومCYP2E1

يعتبرأحد أهم الأنزيمات السيتوكرومية المحرضة بالإيثانول وينتشر بكـل مـن الكبـد والكلـى واللمفاويات (Katalir وآخرون، 2004). يبدي النشاط الأنزيمي لـ CYP2E1 البشري تنوعـا معتبـرا بين الأفراد، ويلعب دورا هاماّ في الإقلال من السمية بقدرته الفائقة على استقلاب المسرطنات منخفضة الوزن الجزيئي (Kwab وآخرون، 2003)، وهو أكثر السيتوكرومات توليدا للجذور الحـرة النشـطة (ROS) باختزاله للـ dioxygene. تغزو الـ ROS الفوسفوليبيدات الغشائية بالشبكة الأندوبلازمية محدثة أكسدة ليبيدية، فقد وظيفي، نكرزة نسيجية (Jong وآخرون،2005)، ولعل هـذا هـو مـرد بعـض الالتهابات الكبدية مثل السيروز والسرطان. و أهم مواد التفاعل التي تستعمل بالدراسات التجريبية هي chlozoxazone 6 hydroxylation. ويتموقع الـ CYP2E1 على 10q242 بالكرومزوم البشري ويتنـوع نشاط هذا الأنزيم عبر الأفراد باختلاف التنظيم الجيني والذي يحكمه التعدد المظهري ويـنعكس هـذا بمعدلات عالية من mRNA الكبدي (Marcella وآخرون، 2006).

2.1.4.1 السيتوكروم CYP3A4

ينتمي السيتوكروم CYP3A4 إلى جين تحت العائلة (CYPA) ينتشر بكبد وأمعاء الإنسان ويكافئ حوالي 30% من النظام السيتوكرومي (Maurel، 1996)، يكون مسؤولا عن معظم فعاليات الأكسدة والاختزال بالطورالأول إذ يرفع من قطبية الجزيئة المستقطبة لتسهيل طرحها عبر مسارات اسـتقلابية عدة منها C. hydroxylation الأليفاتية وN.dealkylation التي تعتمد كل منها على النزع الهيـدروجيني أو النقل الإلكتروني على التوالي، ومسارات أخرى تعتمد على dehydratation وnitroreduction (Judy وآخرون، 2004). وبالرغم من تنوع مواد تفاعل CYP3A4 إلاّ أن الـ rifampicin يعتبـر نـوعي الاستقلاب.

2.4.1 التثبيط السيتوكرومي

تثبط بعض المواد كلا من السيتوكرومات وكـذا الجليكـوبروتينP (Michihara وآخـرون، 2005)، ويتغاير هذا التثبيط من فرد لآخر، وقد يحكم ذلك عادات الأكل و الغذاء، السلالات وحتـى السـوابق المرضية (Siess وآخرون، 2000). ويحكم الفعل التثبيطي آليات شتى كألكلة النيتـروجين البيرولـي لمجموعة الهيم أو تنشيط نصف الهيم منتجا الـROS التي ترتبط بالموقع البيبتيدي المستهدف وكذ الكلة وأستلة النصف البروتيني كما هو الحال مع CYP2B1 (Guengerich، 1995). إن تسرب الأوكسجين النشط من CYP4A1 يؤثرعلى الكاربون الطرفي ترموديناميكيا لمجموعته acetylenic مؤديا إلى تحرر الـketene وبذا يكون تغير البروتين أقل من تحطيم الهيم . ويتضح من هذا أن المفاهيم الأكثر قبـولا في مجال التثبيط أن أيسلة البروتين أقرب تأثيرا على المجاميع طويلة السلسلة من حالات هـدم الهـيم التي تتطلب مستبدلات هيمية (Cajacob وآخرون، 2000). تتوقف شدة التثبيط على ثابـت الارتبـاط النسبي لكل من مادة التفاعل والمثبط وتركيز هذه المادة على الموقع الأنزيمـي (Correa وآخـرون، 1993). وقد أجملت آليات تثبيط السيتوكرومCYP3A4 بمضاد الفطر azole كما يلي: يسـلك المثـبط مسلكا تنافسيا سريعا، كما أن مستبدل N-alkyl المركب ينتج مستقلبا وسـيطا كمعقـد يختـزل هـيم الـCYP3A4، ويتدخل الـerythromycin بآلية انتحارية غير عكوسة منتجا بذلك مستقلبا نشطا يرتبط تساهميا بالأنزيم مثبطا إياه، (Yue وآخرون، 2004).

2- مضادات السـ ـ ـ ـ ـل

صنّفت مضادات السل إلى مضادات حيوية من الرتبة الأولى أو الرئيسية، وأخرى مـن الرتبـة الثانية والتي توصف إثر ظهور حالات مقاومة لعصيات*Mycobacterium tuberculosis*، وأشهر هـذه المضادات: isoniazid (INH) وrifampicin (RMP) و<u>ethambutol</u> وpyrazinamide وstreptomycine (Bluck وآخرون، 1975). ولتفادي حدوث المقاومة صنّفت خريطة دوائية تقتضـي تعـاطي الـدواء بشكل متزامن، حيث يؤخذ كل من INH وRMP لمدة قدرها 6 أشهر وتعقب بتعـاطي pyrazinamide مصحوبا بكل من INH وRMP لمدة 4 أشهر إضافية، كما أشير إلى أن التعاطي المتزامن لكـل مـن INH وRMP يكون ناجعا إذا استغرق 4 أشهر (Drhuzennova وآخرون، 1983).

لم يفلح قبل 1944 تشخيص علاج ناجع لداء السل إذ يركن المريض جانبا للراحة، وحتى غايـة سنة 1952 تصدر كـل مـن الـ isoniazid وstreptomycine وrifampicin وكـذا pyrazinamide المضادات الحيوية كمضادات للسل (Ellis، 1986). ويحدث مرض السل إثـر الإصـابة بعصـيات حمضية كحوليـة مقاومـة أو بكتيريـا *Mycobacteruim tuberculoses* و*M. africanum* و*M. bouis*، وتتفاقم الحالة بالظروف المعيشية و كذا داء السيدا، كما أن التعاطي الدوائي لـ corticoide ومضادات السرطان، وانخفاض القدرة المناعية تكون أرضية مهمة لهـذا الـداء (Hyman ، 1995). وتحـدث

العدوى الأولية بداء السل إثر ابتلاع قطيرات تضم البكتيريا والتي تخترق المساحات الرئوية نظرا لصغر حجمها (Ortenberg، وآخرون 1985) لتحدث فعاليات البلعمة الجرثومية، إلاّ أنّها قد تتكاثر داخل الماكروفاج لإحداث تفاعل التهابي لا نوعي قد يتطور إلى الالتهاب الحويصلي الرئوي، كما قد تتسلل هذه العصيات عبر الطريق اللمفاوي ثم إلى الأعضاء عبر المسار الدموي (Nariman، 1988) وقد شخص التفاعل الالتهابي الموضعي بظهور اللمفاويات T (Snider، 1984).

إن التعاطي المتزامن يرجى منه تدارك وضع المقاومة، حيث وجد أن الطفور البكتيرية تكون مقاومة بنسبة 10^{-5} بالنسبة لـ INH وstreptomynine وبنسبة 10^{-5} إلى 10^{-6} بالنسبة لـ ethambutole و10^{-7} إلى 10^{-8} بالنسبة لـ rifampicin. وتوجد مخططات علاجية شتى: منها مخطط العلاج الرباعي الذي يقتضي التعاطي لكل من isoniazid وrifampicin وpyrazinamid ليضاف الـ ethambutol خلال الأشهر الأربع اللاحقة (Ndanusa، 1997)، في حين يعنى المخطط الكلاسيكي بعلاج طويل مداه 9 أشهر، يتعاطى فيه خلال الشهرين الأولين pyrazinamid وrifampicin وethambutol ثم isoniazid وrifampicin بمفردهما خلال السبعة أشهر الباقية (Snider، 1984).

وتعتمد الجزائر كغيرها من الدول السائدة في طريق النمو على طرق العلاج القياسي الذي يتراوح ما بين 12 إلى 18 شهرا، ليتناول بالشهرين الأولين isoniazid، streptomycine، thiacetazone ثم بالأشهر العشر اللاحقة يؤخذ كل من isoniazid وthiacetazone.

Isoniazid 1.2

ينحدر الisoniazid كيميائيا من مشتقات isonicotinic وحدد نشاطه ما بين 1945-1952، حيث صنع من أسترات مثيل حمض الisonicotinic، وانصب الاهتمام على هذا الوسيط (isonicotyl hydrazid) (iBlair وآخرون،1985) وهو جسم ($C_6H_7N_3O$) أبيض متبلور وزنه الجزيئي 137.1 ينفذ بيسر داخل الخلية مما يؤهله للقتل الداخل خلوي، وكذا يؤثر على الليبيدات وتخليق الأحماض النووية وتثبيط تصنيع أهم أحماض الجدر البكتيرية (myolic acid) ومثبط لعمل الا catalase، ويوقف تشكل المعقدات المعدنية (Stuart وGrayson، 1999).

1.1.2 صيدلانية الـ Isoniazid

يمتص الـ INH فور الجرعة الفموية أو تحت الصفاقية جيدا، ليصل التركيزذروته بالدم بعد ساعة أو ساعتين من التعاطي. إذ قد تصل إلى(3-5µg/ml) إثر تعاطي جرعة قدرها mg/Kg 5 وينتقل إلى السوائل البلورية و سوائل النخاع الشوكي (Palmai وCaelos، 1974). يرتبط حوالي 15-20% من INH بالبروتينات المصلية.

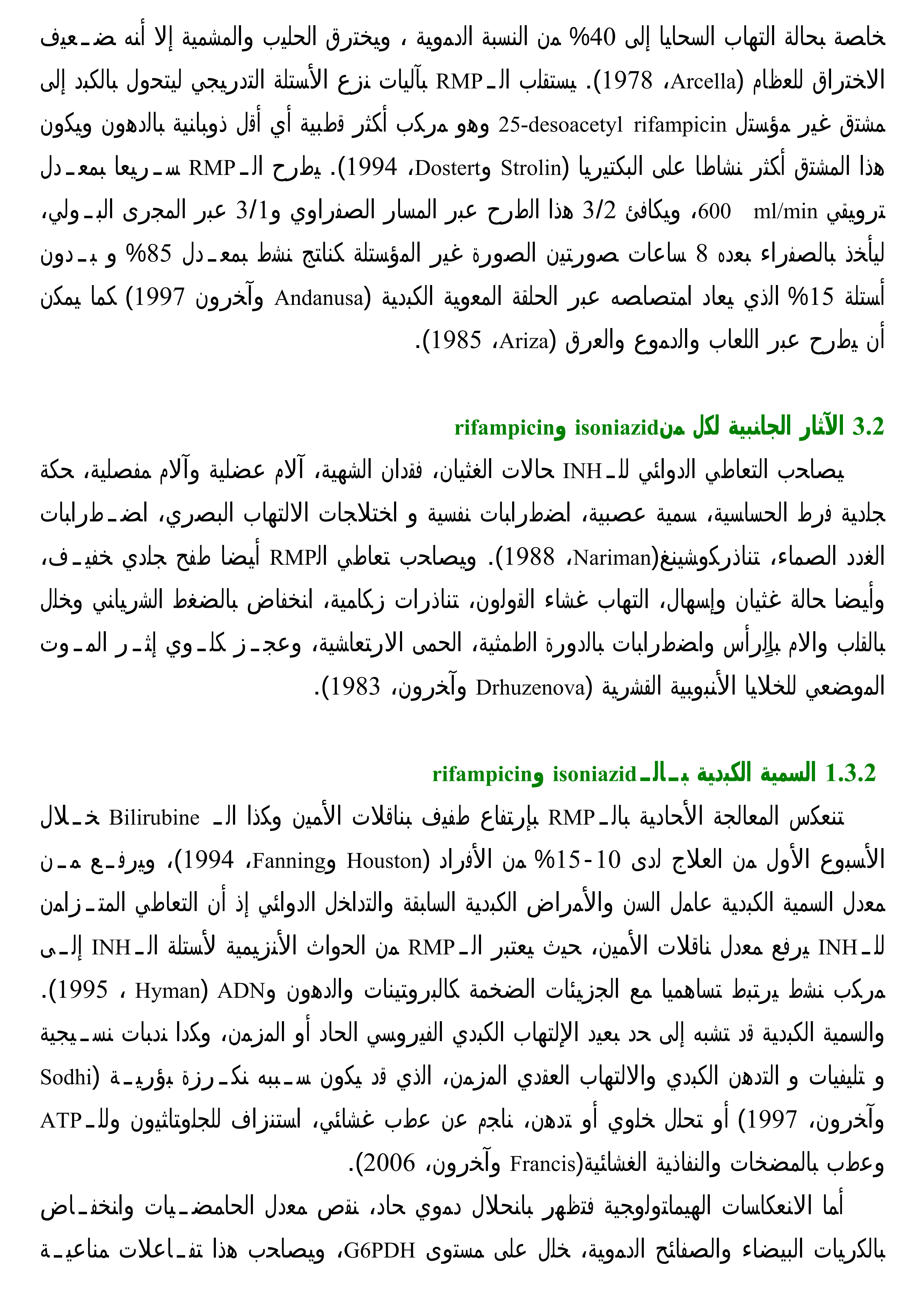
يرتبط نصف العمر الحيوي لـ INH بعمليات الأستلة، حيث أن العشائر البشرية تتمتع بنظام أستلة يخضع إلى التنميط الوراثي والذي يتوقف بدوره على أنزيم acetyl transferase حيث يبلغ 60 إلـى90 دقيقة لدى المؤستل السريع و 120 إلى 180 دقيقة لدى المؤستل البطيء، و يطول هذا النصف العمـر الحيوي في حالات العجز الكبدي. يمثل الـ INH ميتابوليزميا عبر فعاليات الأستلة في وجود acetyl transferase الكبدي ليتحول إلى مشتق غير فعال على البكتيريـا ويتحـول حـوالي 50% مـن INH المؤستل إلى حمض الـ ـ isonicotinic وhydrazine monoacetyl (Sarich، 1996)، يسـتقلب هـذا الأخير عبر النظام الميكروزومي سيتوكروم CYP450 وبوجود الـNADPH والـO_2 إلـى مسـتقلب نشط عالي السمية (Yue وآخرون، 2004) يرتبط تساهميا مع الجزيئات الضـخمة مثـل البـروتين الدهون مسببا إتلافها، ويحرض على التحلل الخلوي والنكرزة (Hartmut وآخرون، 2002)، وتبـدي المؤستلات السريعة قدرا أكبر من هذا المستقلب النشط. يطرح الـINH عبر المجـرى الكلـوي بمـا يكافئ 75-95% ليطرح بشكل حر أو في صورة ، acetyl hydrazine، حمـض isonicotinic. تبلـغ القدرة الترويقية لدى الإنسان 41 ml/min (Schorderet، 1992).

2.2 Rifampicin

عزل الrifampicin سنة 1957 انطلاقا مـن نـواتج *Nocadia mediterranie* (Arcella،1978)، ويحتوي المشتق الخام على 5 مركبات منها:rifamycin A، rifamycin E وrifamycin B، ويفتقد هـذا الأخير للنشاط المضاد الحيوي وبإمكانه التحول إلى محلول مائي نشط وهوrifampicin الـذي يختـزل إلى rifamycin SV ذي التـأثيرعلى الجـراثيم موجبـة الجـرام ($Gram^+$) مثـل *Mycobacterium tuberculosis* وكـذا بعـض الجـراثيم سـالبة الجـرام ($Gram^-$) (Pessayre, آخـرون، 1977). والrifampicin مركب يتشكل من سلسلة أليفاتية تربط نواتين أرومـاتيتين، قابـل للـذوبان بالأوسـاط الحمضية (Arcella، 1978). يقارب نشاط الـ rifampicin مجال نشاط rifamycin B الذي يتمثل في الأثـر القاتـل للبكتيريـا المخاطيـة (, ,*M. tuberculosis*، *M. africanum*، *M. bouis*)، يتغلغـل الـrifampicin نظرا لقدرته الذوبانية بالدهون بسهولة داخل خلويا لقتل العصـيات (Periti وآخـرون، 1989)، يكافئ الـ CMI (أدنى تركيز تثبيطي) الـ mg/l 0.4 بالوسط الجلوكوزي (Snider وآخرون، 1984).

1.2.2 صيدلانية Rifampicin

يمتص الـRMP كلية إثر الجرعة الفموية ليصل التركيز البلازمي ذروته 10 mg/l إثـر تعـاطي mg 600، بعد ساعة إلى ثلاث ساعات. ونظرا لذوبانيته الفائقة بالدهون فإنه يتغلغل بسهولة بمختلـف الأعضاء. ويثبت الـRMP بالبروتينات البلازمية بنسبة 70% و تصل نسبته بسوائل النخاع الشـوكي



خاصة بحالة التهاب السحايا إلى 40% من النسبة الدموية ، ويخترق الحليب والمشمية إلا أنه ضـعيف الاختراق للعظام (Arcella، 1978). يستقلب الـRMP بآليات نزع الأستلة التدريجي ليتحول بالكبد إلى مشتق غير مؤستل 25-desoacetyl rifampicin وهو مركب أكثر قطبية أي أقل ذوبانية بالدهون ويكون هذا المشتق أكثر نشاطا على البكتيريا (Strolin وDostert، 1994). يطرح الـRMP سـريعا بمعـدل ترويقي ml/min 600، ويكافئ 3/2 هذا الطرح عبر المسار الصفراوي و3/1 عبر المجرى البـولي، ليأخذ بالصفراء بعده 8 ساعات صورتين الصورة غير المؤستلة كناتج نشط بمعـدل 85% و بـدون أستلة 15% الذي يعاد امتصاصه عبر الحلقة المعوية الكبدية (Andanusa وآخرون 1997) كما يمكن أن يطرح عبر اللعاب والدموع والعرق (Ariza، 1985).

3.2 الآثار الجانبية لكل من isoniazid وrifampicin

يصاحب التعاطي الدوائي لـ INH حالات الغثيان، فقدان الشهية، آلام عضلية وآلام مفصلية، حكة جلدية فرط الحساسية، سمية عصبية، اضطرابات نفسية و اختلاجات الالتهاب البصري، اضـطرابات الغدد الصماء، تناذركوشينغ(Nariman، 1988). ويصاحب تعاطي الRMP أيضا طفح جلدي خفيـف، وأيضا حالة غثيان وإسهال، التهاب غشاء القولون، تناذرات زكامية، انخفاض بالضغط الشرياني وخلل بالقلب والام بالرأس واضطرابات بالدورة الطمثية، الحمى الارتعاشية، وعجـز كلـوي إثـر المـوت الموضعي للخلايا الأنبوبية القشرية (Drhuzenova وآخرون، 1983).

1.3.2 السمية الكبدية بـالـ isoniazid وrifampicin

تنعكس المعالجة الأحادية بالـRMP بإرتفاع طفيف بناقلات الأمين وكذا الـ Bilirubine خـلال الأسبوع الأول من العلاج لدى 10-15% من الأفراد (Houston وFanning، 1994)، ويرفـع مـن معدل السمية الكبدية عامل السن والأمراض الكبدية السابقة والتداخل الدوائي إذ أن التعاطي المتـزامن لـINH يرفع معدل ناقلات الأمين، حيث يعتبر الـRMP من الحواث الأنزيمية لأستلة الـINH إلـى مركب نشط يرتبط تساهميا مع الجزيئات الضخمة كالبروتينات والدهون وADN (Hyman ، 1995). والسمية الكبدية قد تشبه إلى حد بعيد الإلتهاب الكبدي الفيروسي الحاد أو المزمن، وكذا ندبات نسـيجية و تليفيات و التدهن الكبدي والالتهاب العقدي المزمن، الذي قد يكون سـببه نكـرزة بؤريـة (Sodhi وآخرون، 1997) أو تحلل خلوي أو تدهن، ناجم عن عطب غشائي، استنزاف للجلوتاثيون وللـATP وعطب بالمضخات والنفاذية الغشائية(Francis وآخرون، 2006).

أما الانعكاسات الهيماتولوجية فتظهر بانحلال دموي حاد، نقص معدل الحامضـيات وانخفـاض بالكريات البيضاء والصفائح الدموية، خلل على مستوى G6PDH، ويصاحب هذا تفـاعلات مناعيـة

تتجلى في وجود الـ IgG، Igm التي تلتصق بالصفائح الدموية تنعكس باختلالات على مستوى الـتجاط (Ortenberg وTazhudinova ، 1984).

4.2 الإستقلاب الكبدي لمضادات السلisoniazid و rifampicin

تخضع المضادات الحيوية إلى تحولات أيضية بالخلية الكبدية بتدخل الأنزيمات المحفّـزة للجهـد الردوكسي عن طرق إدخال المجاميع القطبية لتسيير الإفراز الكبدي أو الطرح الكلـوي. فالمضـادات ذات القابلية الذوبانية بالدهون تتحول إلى مركبات قابلة للذوبان بالماء، بتدخل أنزيمات الطـور الأول المؤكسدة وأنزيمات الطور الثاني المقترنة (بإضافة: glucoronic acid، sulfate، glutathione، amino acid) (Janos وآخرون، 2006). تتموقع أنزيمات كل من الطور الأول أو الطور الثاني بالسـتيوزول والميتوكوندريا وأغشية الشبكة الأندوبلازمية التي أحيانا تأخذ الشكل الحويصلي وتعرف بـالميكروزوم (Hartmut، وآخرون، 2002).

1.4.2 تفاعلات الطور الأول

تملك مختلف السيتوكرومات (الطورI) نفس المركز التحفيزي (حديد الهيم) بينما تختلف الطلائـع البروتينية والمسؤولة عن التنوع isocytochromes وisoenzymes. تنشط السـيتوكرومات تفـاعلات الـmonooxygenase لهدرسكلة أو أكسدة المضـاد الحيـوي المثبـت بـالموقع النشـط (Mookan وآخرون،2000)، مؤمنا بذلك التحول من الحالة الليبوفيلية إلى مستقلبات أكثر هيدروفيلية أثر فعاليات الأكسدة (keith وآخرون، 2006) أحيانا تكون سامة، قد تغزو الجزيئات الضـخمة وحتـى CYP450 ذاتها (Allan وConney، 2003). بالإضافة إلى النشاط monooxygenase فإن السيتوكرومات تنشـط فعاليـات peroxidase، reductase، nonaminooxydase، xantinoxydase وhydroxylase (Ann De وLiska، 2001).

2.4.2 تفاعلات الطور الثاني

تمثل تفاعلات الإقتران لمستقلبات الطورI أهم فعاليات الطور الثـاني ، ويحـدث ذلـك بالنقـل الأنزيمي في حضورtransferase بتواسط مركبات غنية بالطاقة، كما يمكن لتفاعلات الطورII بـدورها من توليد مركبات نشطة أو حتى سامة (Wrighton وStevens، 1992). كما تم مؤخرا إضافة مرحلـة ثالثة (الطورIII) وهو ما يعرف بـP-glycoprotein multidrug resistance والتي تم تصـنيفها كنظـام ثالث من أنظمة إزالة السـمية (Jaeshker وGores،2002)، وهـي مضـخة طاقويـة تقـوم بضـخ الـxenobiotics خارج الخلية، ويتموقع هذا النظام بكل من الكبـد والأمعـاء منسـقا مـعCYP3A4، ويعززبهذا إزالة السمية وطرحها عبر الأمعاء قبيل دخولها إلى الدوران. وقـد صـنف نمطـين مـن

الجينات المنظمة لهذه المضخات وهي MDR_1 و MDR_2، و ينتشر الأول بالطلائية المعوية والكبدية والكلوية والمخ والخصي أما الـ MDR_2 فقد اكتشف أولا بالكبد ويماثل دور الـ MDR_1 بالأمعاء ولا يزال غير محدد الوظيفة بشكل نهائي (Mishihara وآخرون، 2005).

3- الفلافونيدات والنظام الرودوكسي

1.3 الخصائص البيولوجية للفلافونيدات

أمكن تحديد أول نشاط بيولوجي للفلافونيدات إنطلاقا من إكتشاف Szent Gyorgyi بجامعة Szeged بالمجر للفينامين C والذي بمؤداه حصل على جائزة نوبل سنة 1937 ، إذ ربط بين الهشاشة الوعائية والعوز الفيتاميني والذي زال بتعاطي عصير غني بالفيتامين C ومركبات لقبت فعاليتها بفيتامين P (Middleton ، 1996). وعقب ذلك بسنوات تداول مفهوم الجذور الأوكسجينية النشطة ROS وإنعكاساتها الممرضة ، وأعتبر Halliwell وآخرون (1986) مدرسة لخصت آليات تدخل الفلافونيدات كمضادات أكسدة بالشكل التالي:

1 – أسر الجذور الأوكسيجينية النشطة ROS .

2 – التثبيط الأنزيمي ومخلبة الآثار المعدنية المولدة لـ ROS .

3 – حماية الأنظمة المضادة للأكسدة الداخل خاوية.

لقد أدلت العديد من الدراسات *in vivo* و*in vitro* والتي أعتمدت على الفلافونيدات ذات الدور الحيوي (Bioflavonoids) ، بأن هذه الفلافونيدات يمكنها أن تسلك مسلك المقوي الوعائي بإختزال النفاذية الغشائية عن طريق تثبيط أنزيمات : histidine decarboxylase وأelastase وhyaloruomidase للحفاظ على المادة الأساسية بالقميص الوعائي كما هو الحال بالنسبة لـ rutin (Cody وآخرون، 1986). ويبدي كل من الـ apizenol وchryzing وtaxifoling دورا مضادا للإلتهاب نظرا لتداخلها مع ميتابولزم حمض الأراشيدونيك (Loguercio وآخرون، 2003) . وأعتبرت الـ isoflavones خاصة منها الـ genistein مشابهات لـ œstrogenes وبدائل لمنع الحمل (Rice-Evans وآخرون،2001). بينما أعتمدت الـ quercetin وluteoling وkaempferol مضادات للتشنج ، مسكنات ، مضادات للتقرح ، مانعات للحساسية و مثبطات لـ phosphodiesterase المضاد للتكتل الصفائحي (Lysandro وآخرون، 2006) . بينما تكون الفلافونيدات الميتوكسيلية مضادات بكتيرية ومضادات فيروسية (Aruoma وCuppett، 1997) ، مضادات سرطانية ومضادات للطفور (Day وآخرون، 2000). ولم يهمل الدور الوقائي للفلافونيدات حالات الإلتهابات الكبدية حيث أبدت كل من isobutrin وhispidtuling وflavonolignans خاصة منها silymarin فعلا وقائيا وعلاجيا إذ أعتمد sylibin وهو أحد مقترنات dihydroflavonol وكحول coniferyl كخليط مضاد للسمية الكبدية تم أدراجه بالمستحضرات الطبية التجارية (Frantisek وآخرون، 1998).

2.3 الدور الوقائي الكبدي للفلافونيدات

تكتسح الأمراض الكبدية المختلفة العالم إذ تتباين من حالات التدهن والتليف إلى الإلتهابات الكبدية الحاد منها والمزمن؛ ويصاحب مختلف أنماط الإلتهاب الكبدي توليد الجذور الحـرة النشـطة (ROS) وتراجع للأنظمة المضادة للأكسدة. وتشكل كل من الأنزيمات الميتوكوندرية والميكروزوميـة بالخليـة الكبدية مصادر رئيسية لهذه الجذور. كما تساهم خلايا كبفر والخلايا الإلتهابية كالمتعادلات والبالعـات الكبرى في توليد قسط وافر منها (Jaeschke وBors، 2002). تـنعكس تـأثيرات الـ ROS بتـراكم الكالسيوم، إختلالات هيموستازية، تحفيز التعبير الجيني للسيتوكينات، تخليق أوكسيد النتريـك (NO)، تقطيع الـADN، إختلالات الأنظمة الردوكسية والأيـض الخلـوي (Formica وRegelson، 1995). ويصاحب هذا ارتفاع معدلات الـMDA وكذا 4-hydroxy nonenal (4-HN)، كما قد يتفاعل الـ $O_2^{\circ-}$ فورا مع أكسيد النتريك منتجا البيروكسي نتريت والذي يشكل خطرا يتربص بمجاميع الـSH المرتبطة بالوظائف الأنزيمية. كما يساهم أوكسيد النتريك في تجزئة الـADN وعطب الوظائف الميتوكوندريـة بإستنفاذ الـATP الواعد بحالات التدهن والتليف الذي قد ينتهي بـالنكرزة (Guntupalli و آخـرون، 2006).

وللتصدي لهذه الإختلالات إنصب الإهتمام سابقا على تعزيز الغذاء بالأحماض الأمينية وزيت الزيتون وعصائر اللّيمون، ثم التوجه نحو موانع الأكسـدة الطبيعيـة والمصـنعة مثـل: N-acety-cystein، - αtocopherol، vitamine C، الفينـولات والسـيلينيوم (Carmella وAllessandro، 2003). واتجهـت الدراسات الحديثة إلى مراجعة أساليب الطب الشعبي من حيث التعرف على المواد الفعالة والتحكم في الجرعة وطريقة التعاطي لإدراجها بشكل رسمى إكلينيكيا. ومن أهم النباتات الغنية بالفلافونيدات التـي تم تداولها في علاج أمراض الكبد نبات *Silybium marianum* (Compositae) (شوك النصارى، شوك الجمل)؛ فقد أشار ما يزيد عن 450 بحثا إلى أن من أهم مكونات *Silybum* الـ flavonolignans بمـا فيها silybin، silydianin، silychnistin والتي تعرف في مجموعها بـsilymarin؛ يتركز تواجدها بكل من البذور والثمار (Wren، 1989). وقد ظهر بأن تعاطي 420 mg يوميا لمدة أربع أسـابيع يخفـض معدل ناقلات الأمين ويكون ذلك وفقا لآليات منع الأكسدة بإختزال معدلات الـ MDA ومنـع تشـكل الـleukotreine، مجددا للخلايا الكبدية، مانعا للتليف بإختزال الخلايا النجميةبتسـبة 75% (Prostova وآخرون، 2002) ومنشطا لأنزيمات الطور الأول (النظام السيتوكرومي) وكذا النظام الجلوتـاتيوني؛ وقدرت الجرعة اليومية للإنسان 1750 mg يوميا (Wren، 1989).

أعتمدت جذور *Picrorhiza* (Scrofulariaceae) في علاج الاحتباس الصـفراوي وذلـك لغناهـا بالمجموع kukton . وقد أبدت نجاعتها على السـمية المسـتحدثة بكـل مـن CCl_4، galactosamin، ethanol، الـaflatoxin والـamanite. وبالرغم من أن آليات تأثيره غير واضحة جيدا فهو يخفـض

ناقلات الأمين ومعدلات MDA ومثبط لمولدات الـ $O_2^{°-}$ وممخاب معدني ومانع لإستنفاذ GSH ومماثل لتأثير الـ SOD، محدد للالتهاب ومجدد للمخلايا الكبدية؛ يقدم بشكل كبسولات 4% من kukton و تقدر الجرعة اليومية بـ (400-1500 mg) (Dhawan، 1995). أظهرت عشبة *Hypericum perforatum l.* (*Clusiaceae*) الغنية بالفلافونيدات والفينولات استجابة واضحة لمنع اليرقان والإلتهاب الفيروسي عند تعاطيها في صورة منقوع (Scott، 1998). واستغلت *shizandrin chines* في علاج الإلتهابات الكبدية المزمنة انطلاقا من سنة 1997، إذ أمكن لـ (4 mg - 1.5 يوميـا) مـن خفـض نـاقلات الأمـين، والبروتينα ومنع ارتفاع البليربين؛ ويبدو أن فعاليته تقتضي تعاطيه بمعدل 7.5-15 mg يوميا لمـدة لا تقـل عـن السـنة. (Yina وآخـرون، 1993؛ Scott، 1998). اسـتعملت أوراق *Cynarae folium* (Compositae) كمدرات للصفراء لغناها بالفينولات العديدة مثـل caffeic acid 2%، flavonol (0.1-1%) و أهمها مشتقات luteolin، ويظهر أثرا أبلغ مقارنة بـ silybin بالدراسـات *in vitro* بـالعزلات الكبدية المعرضة لـ CCl_4، ووجد أن الجرعة 400 mg تمنع تولد الكولسترول الكبدي ومخفضة للدهون (Millis وBone، 2000). أبدى سـن الأسـد *Taraxacum officinae weber* (Compositae) الغنـي بالفلافونيدات وtaraxinic acid دورا وقيا من اليرقان وفقدان الشهية عندما تؤخذ جـذوره كمشـروب يعزز التدفق الصفراوي (Galestio وآخرون، 2006). اهتم الطب الهندي بجذور *Phyllantus amarus* (Euphorbiaceae) لغناها بالفلافونيدات والقلويدات واستعملت كواقيات كبدية خاصة ضـد الإلتهابـات الفيروسية، بينما ركز الطب الصيني علـى جـذور *Bupleurum falcatum* (Umbelliferae) لغناهـا بالـpectin والـphytosterols حيث أظهر تعاطي 3-12 g يوميا من الجذور أو 8 مل من المسـتخلص المائي دورا واقيا للكبد ومخفضا للحمى (Bor وآخرون، 2006). أظهر الـ *Desmodium ascenders* (Leguminoseae) دورا مضاد للسمية الكبدية المستحدثة بالدواء والـ CCl_4 والإلتهابـات الفيروسـية (Hen وآخرون، 2005). كما عرف الجزر منذ القدم في العلاج الكبدي لغناه بالفلافونـات (apigenin، chrysin، luteolin) والفلافانول (kaempferol، quercetin) ، فهو يرفع كفاءة الكبد عند الجرعة 2-4 g ثلاث مرات يوميا أو بإستعمال المستخلص من 2-4 ml (1:1% كحول ثلاث مرات يوميـا) (Newall وآخرون، 1996). إن أوراق *Peunus beldus* (Monimiaceae) الغنيـة بالفلافونيـدات والقلويـدات اعتمدت كمنشطات كبدية إذ يستعمل المستخلص المائي-الكحولي كواقي كبدي عند الجرعـة اليوميـة 60-200 mg بشكل منقوع بمعدل ثلاث مرات يوميا (Wren، 1989).

3.3 النشاط البيولوجي لجنس *Chrysanthemum*

تتلخص الأدوار البيولوجية والصيدلانية لجنس *Chrysanthemum* بالجدول (1.B)

جدول (1.B) الأنشطة البيولوجية والصيدلانية لجنس *Chrysanthemum*

النوع	النشاط البيولوجي	المرجع
inducuim	المستخلص الميثانولي للأوراق(فلافون جليكوزيدي) مثبط لـ aldose reductase	Matsuda وآخرون،2002
	مستخلص النبات الكلي: مضاد للعطب الميوكاردي ميثانولي	Li Yo، 1981
	Sesquiterpenes الأوراق مثبط لـ aldose reductase	Yoshikawa وآخرون، 1999
	المستخلص المائي: مضاد بكتيري	Zhu، 2005
	المستخلص المائي للأوراق: ديناميكية الدم والدوران التاجي	Kato وآخرون، 1986
	المستخلص الميثانولي للأوراق مثبط لـ xanthine oxidase	Kong وآخرون، 2000
	المستخلص الإثانولي مضاد للإلتهاب ومعدل مناعي	Cheng وآخرون، 2005
	مستخلص البذور: مضاد فطري	Wang وآخرون،2001
	مستخلص الأزهار: زيوت أساسية مضاد فطري	Alvarez وآخرون، 2001
	مستخلص الأوراق: مضاد للأكسدة	Ukiya وآخرون، 2002
	النبتة الكلية مضاد للأكسدة	Takenaka وآخرون، 2000
	الزيوت الفعالة من النبتة الكلية: مضادة بكتيرية	Kim وآخرون، 2003
morifolium	النبتة الكلية: مثبط لبلازموديوم القوارض	Zhao ، 1996
	مضاد للأكسدة و مضاد فيروسي	Hen وآخرون، 2005
lecanthemum	مستخلص مائي للنبتة الكلية مثبط لـ xanthine oxidase	Chen وآخرون، 2005
	مستخلص نباتي: فلافونيد جلوكوروفيدي مضاد لـ HIV	Lee ،2003
	مستخلص الأوراق 3α- hydroxytriterpanoid: مضاد للسل	Toshihiro وآخرون، 2005
	المستخلص المائي للنبتة الكلية محرض على إفراز الأنسولين	Hussain وآخرون، 2001
balsamita	مستخلص النبتة الكلية واقي كبدي بالجرذان	Coprean وآخرون، 1991
viscidohirtum	زيوت أساسية بالنبتة الكلية: مضاد بكتيري ورخوي	Khalouki،2000
species	المستخلص المائي للأوراق مضاد للأكسدة ومثبط لـ nitric oxide	Bor وآخرون، 2006


الدراسات التجريبية

الدراسـات التجريبية

1 مواد وطرق العمل

مواد العمل

1. تحضير المجنس الكبدي والميتوكندريا

تغسل الأكباد بـ % 1.15 منKCL الثلجي (w/v) لتجنس فـي 4 أحجـام مـن مـنظم Tris-HCl،(pH = 7.4) ويحوي mM 20 من sucrose و1.15 % KCL، يطرد هذا المجـنس علـى g × 600 لمدة 10 دقائق وعلى g x 17000 لمدة 10 دقائق أخرى لترسيب كل من الأنوية، الفضـلات الخلوية والميتوكندريا على التوالي (Hageboom ، 1995)، وتغسل الميتوكوندريا بـ M 0.15 مـن KCL لتستقبل على نفس المحاول.

2. العزلات الكبدية

لتحضيرالعزلات الكبدية تم إتباع فيها طريقة Segelen (1973)، حيث روي الكبد بواسـطة Ca^{+2} وMg^{+2} HBSS (منظم هنك) الذي يحتوي على EGTA 0,5 mM وHEPES 50 mM (PH 7,3)، بمعدل تدفقي قدره (8- 10 min) 30 ml/min، ثم اتبع هذا بتروية ثانية باستعمال البيئة المغذيـة RPMI 1640 محتويا على collagenase 276,64 U/ml و 50 mM HEPES (PH 7,4) على درجة 37°م، أرفقـت الأكباد المعاملة بعدئذ بأطباق بتري المزودة بـ PRMI- 1640 و HEPES 50 mM، رشـحت الخلايـا الكبدية المفصولة ميكانيكيا (مرشح 100- mesh) ثم طردت مركزيا علـى 50 x g وغسـلت ثـلاث مرات بالبيئية المغذية، حددت حيوية الخلايا (> 90 %) بواسطة أزرق التربيان وانتقيت 0.75×10^6 خ لكل مل لترفق بالأقراص المزرعية المتعددة multi- well dishes، ولتنمى بشـكل مزرعـة علـى RMPI- 1640 مدعمة بـ 10% مصل جنين البقر (FBS)، 100 /ml UI من البينيسلين Penicilin و streptomycin 100mg/ ml و 10 mn dexamethasone ثم احتفظ بها على درجـة 37° م ورطوبـة جوية مزودة بـ 5 % CO_2، ثم شفط الـ RPMI بعد تحضين قدره 30 دقيقة.

وعرضت الخلايا المزرعية إلى بيئة طازجة (1 ml) تضم 100 µM مـن الـ- hydrazine أو بـدون المركبات تحت الاختبارلإجراء المعايرات المطلوبة.

3. عزل المتوكوندرية الكبدية

يتم استخلاص الميتوكوندريا من المجنس الكبدي وفقا للعديـد مـن الطـرود المركزيـة (Chatterjee وآخرون، 1997)، حيث جنس الكبد (6 g/ml) بحمام ثلجي : (Tris (20 mM، (Sucrose (250 mM،

EGTA (2 mM)، $MgCl_2$ (5 mM)، pH 7.2 على درجة حرارة 4°م) ثم يطرد هذا المجنس على g x 2000 لمدة 10 دقائق. ويطرد الطافي ثانية على g x 1200 لمـدة 5 دقـائق ثـم تغسـل الأجـزاء الميتوكوندرية مسـتقبلة علـى المـنظم KH_2PO_4 (10 mM)، sucrose (200 mM)، pH 7.2 علـى 25 °م لأجل المعايرات الأنزيمية والأنشطة التنفسية.

4. التحضير الميكروزومي

تم الحصول على الميكروزومات عن طريق التروية الكبدية بالمحلول الملحـي المجمـد 0.9 % (w/v) و التي استعبدت وأخضعت للتجنيس بـ 5 أحجام من 1.15 % من kCl ثـم طـردت مركزيـا على g x 9000 لمدة 20 دقيقة وطرد الطافي ثانيـة علـى g x 105000 لمـدة سـاعة. إن النـاتج الميكرزومي تم إستقباله على 10 mM من منظم Tris acetate (pH 7.4) الـذي يحـوي 1 mM مـن EDTA و20% (v/v) من الجلسـيرول و400 µM مـن phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) وحفظت على درجة 80-.م° تذاب المركبات الفلافونيدية بالمحاليل الملائمة للتجربة بالنسـبة للتجـارب *in vitro* ويستعمل المخلوط التفاعلي (1 ml) الذي يضم 0,2 mg من البروتين الميكرزومي (90- 100pM)، (Yasuna وآخرون، 2001) لغرض تحديد نشاط كل مـن : Aniline hydroxylase، Erythromycine demethylase ، Epoxide hydroxylase، p-nitrophenol hydroxylase .

5. أغشية الكريات الحمراء

أمكن تحضير الأغشية الخاصة بالكرية الحمراء وفقا لما أدلاه (Carell وآخرون،1997) بطـرد الدم الكلي لمدة 5 دقائق على g ×1200 ؛ ويتخاص من البلازما وbuffy coat بفضل المنظم الملحـي الفوسفاتي (PBS). بعد غسيل إضافي فإن الهيماتوكريت(50%) والخلايا تغسل بحمام ثلجي، وتحضر الأغشـية بإضـافة (20 mOsm) مـن PBS الـذي يضـم(0,5 M) phenylmethyl sulphonyl و(1mM) EDTA متبوعا بالرج الخفيف وبعد التحضين البارد لمدة 5 دقائق فإن الأغشية ترسب بعـد الطرد المركزي على g × 14000 لمدة 15 دقيقة على درجة 4°م ليستبعد الطافي ويغسل الراسب مرة واحدة بـ (299 mOsm) PBS البارد.

6. عزل الكريات الحمراء RBCs

استقبل الدم على محلول دكستروز السيترات الحامضي. وللحصول على الكريات الحمراء طـرد هذا الدم مركزيا على g x 3000 لمدة 10 دقائق على درجة 4° . تستبعد البلازما وt وتغسـل الخلايـا الحمراء المتحصل عليها 3 مرات بـ 0.9% من محلول NaCl. تعتمد هـذه الـ hymolysate فـي

مختلف المعايرات (Dodge وآخرون، 1963) .إن مؤشرات الـ hemogramme أمكن قياسها بالعداد الخاص بالمركز الإستشفائي بقسنطينة.

طرق العمل.

1- اختبارات الفعل المانع للأكسدة

1.1 الدور الوقائي للمستخلص البيتانولي لكل من *C. fuscatum*، *C. vulgaris*، *H. cheirifolia* (*in vivo*).

أعتمد بهذه التجربة 6 مجاميع من الجرذان (6 لكل مجموعة) ، واعتبـرت إحـداها مجموعـة شواهد اقتصرت على DMSO ومجموعة أخرى كشاهد موجب زودت بـ mg/kg 25 من Silymarin (Ravi وآخرون، 1979) .بينما عوملت باقي المجاميع بـ ـ ـ (100 ، 200 ، 300 ، 400 mg/kg) لمـدة ثلاثة أيام من المستخلص البيتانولي للنباتات تحت الدراسة عبر جرعة فموية. ثم قتلت بعد 48 سـاعة من حقنها بـ 0.25 ml/Kg من CCL_4 تحت صفاقيا. وقيست الـTBARS المعبرة عـن الـ ـ MDA بأكباد هذه الجرذان وفق لطريقة Ohkawa وآخرون (1979) .

2.1 الدور الوقائي للمستخلص البيتانولي *C. fuscatum* والمركبات الفلافونيدية *in vitro*

1.2.1 الدور التثبيطي للأكسدة اللبيدية (*in vitro*)

1.1.2.1 نظام Fe^{2+}/ ascorbate

حرضت الأكسدة اللبيدية بالمجنس الكبدي بنظام Fe^{2+}/ ascorbate في وجود كـل مـن Ferrous ammonium sulfate و ascorbic acid وTris–HCl لتختبر مختلف تراكيز (10 - 500 µg /ml) لكـل من *C. fuscatum* ، *C. vulgaris* ، *H. cheirifolia* مذابة في الـ DMSO أو المركبات الفلافونيديـة (0.5 – 10 µg/ml) وبعد التحضين ولمدة قدرها ساعة يقاس الـ ـTBARS وفقـا لطريقـة Ohkawa وآخرون (1979).

2.1.2.1 نظام CCl_4 /NADPH

تحرض الأكسدة اللبيدية بـالبروتين الميكروزومـي (1.5 mg protein) فـي وجـود: NADP، Glucose 6-phosphote dehydrogenase، Glucose 6-Phosphotase و CCl_4 وتحضن لمدة 15 دقيقة على درجة 37مْ بعد إرفاقها بالمستخلص البيتانولي (10 - 500 µg /ml) أو(0.5 – 10 µg/ml) مـن المركب الفلافونيدي و تقرأ الـ TBARS وفقا لـ Ohkawa وآخرون (1979) .

2.2.1 إختبارات الأسر الجذري

1.2.2.1 الأسرالجذري لـ $O2^{-\circ}$ بالطريقة اللمعانية (Luminescence)

يولد الجذر $O^{\circ -}_2$ لمعاينة في وجود الـ luminol ، إذ تم تحضين كل مـن xanthin والمركبـات الفلافونيدية (0- 5µM) مذابة في DMSO 1 % (v /v) مع الـ luminol لمدة دقيقتين وحرض توليـد $O^{\circ -}2$ باضافة xanthin oxidase وفقا لطريقة Roback و Gryglewski (1988)؛ وأمكن تتبع اللمعانية الكيميائية على درجة 37 °م لمدة 5 دقائق ، واعتمد الـSOD (100 U/ml) كشاهد موجب. قد تم قياس اللمعانية بإستعمال الصفيحة المجهرية اللمعانيـة MicroluMot , LB 96P , P , ECa , EG Berthold , Wildbad , Germany وأعتبرت لمعانية الشاهد % 100.

2.2.2.1 الأسرالجذري للـ OH° (Deoxyribose)

يولد جذر الـOH° إنطلاقا من تفاعلات Fenton ، اذ يغزو جذر الـOH° الـ deoxyribose ليعطي معقدا ملونا في وجود الـ TBA. إن اضافة مادة آسرة الى هذا التفاعل تتنافس مع deoxyribose فيقلل ذلك من التلون ليقرأ عند 532 nm. وينحصر تركيزالمركب الفلافونيدي مـن (2.5– 50 µM) مذابة في DMSO (2 mM) بحجم نهائي 1 ml . وأعتمد الـ rutin كشاهد مرجعي وبعد التحضين على درجة 37 °م لمدة ساعة يكشف عن اللون وفقا لطريقة Halliwell وآخرون (1989) لتحسـب النسـبة التثبيطية لزوال الـ deoxyribose بفعل المركب تحت الإختبار اعتمادا على :

$$\frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 = \text{deoxyribose النسبة المئوية للتثبيط (\%) لزوال الـ}$$

A_o : امتصاصية الشاهد .

A_1 : امتصاصية المادة تحت الاختبار.

3.2.2.1 الأسرالجذري لـ $DPPH^{\circ}$ (المنح الهيدروجيني)

اعتمدت طريقة Hirono وآخرون (2001) على الجذر $DPPH^{\circ}$ فـي تحديـد الوظيفـة الآسـرة للمركبات الفلافونيدية (1-10 µM) لتمتص الصورة الجذرية عند 515 nm ويعبر بزوال الـلون عـن الفعل الآسر الجذري . وأعتمد الـ isoquercetin كشاهد مرجعي ويحسب وفقا لـ : الأسر الجذري لـ $DPPH^{\circ}$ (%) وفقا لـ :

$$\frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

A_o : امتصاصية الشاهد .

A_1 : امتصاصية المادة تحت الاختبار .

3.2.1 النشاط المخلبي للمعادن

يضاف (0.3 – 10 μM) من المركب الفلافونيدي الى مخلوط التفاعل الـذي يضـم الـ ـ $FeCl_2$ والـ ferrozine (مخلبة الحديدوز) لتقرأ الامتصاصية على 562 nm (Fanas'ev وآخـرون، 1984)، وأعتمد الـkaempferol كشاهد مرجعي. يستدل على القوة المخلبية بانخفاض الامتصاصية حيث:

$$\text{النسبة التثبيطية}\ (\%) = \frac{A_o - A_1}{A_o} \times 100$$

A_o : امتصاصية الشاهد .

A_1 : امتصاصية المادة تحت الاختبار

التحاليل الإحصائية

أدرجت النتائج في متوسط لثلاث مكررات ± S.D. . لأجل المقارنة بين متوسطين تم إستخدام إختبار Student' t ، لأجل المقارنة بين عدد أكبر من المتوسطات تم إستنخدام تحليل التباين.

2. الأثر الوقائي للمستخلص البيتانولي *C. fuscatum* من السمية المستحدثة *in vivo* بمضادات السلINH وRMP و أيضيات الـ INH

الحيوانات التجريبية:

أرفقت ذكور جرذان *Wistar* (150-170 g) بأقفاص تربية وزودت بالغذاء والماء واحتفظ بها فـي ظروف تجريبية قياسية من الحرارة والرطوبة تحت فترات متناوبة من الإضاءة والظلام (12 ساعة).

1.2 إستحداث السمية الكبدية *in vivo* بـ INH وRMP

وزعت الجرذان إلى أربع مجموعات (6 لكل مجموعة)، حيث اعتبرت المجموعة I هي مجموعة الشواهد وزودت بالغذاء القياسي، بينما عوملت جرذان المجموعة II بكل مـن INH وRMP، بحقنـة تحت صفاقية (لكل منهاmg/Kg 50 يوميا) لمدة 15 يوما (Mookan وآخرون، 2000)، بينمـا زودت المجموعة III يوميا بـ silymarin ذي الدور الوقائي الكبدي المعهود بمعدل mg/Kg 25 لمدة قـدرها 15 يوما (Ravi وآخرون، 2001) ثم حقنت بكل من INH وRMP، أما المجموعةVI فهي التي زودت مسبقا بالمستخلص البيتانولي (200 mg/Kg) لمدة قدرها 15 يوما قبل تزويدها بكل مـن INH وRMP. وفي نهاية التجريبية تروى الأكباد عبر الوريد الأجوف السفلي بـ20 مل من محلول ملحي متسـاوي التوتر، ثم تستبعد لأجل الدراسة.

2.2 إستحداث السمية الكبدية *in vivo* بالمستقلبات الدوائيةلـ isoniazid

تم توزيع الجرذان عشوائيا إلى خمس مجموعات، حيث اعتبرت المجموعـة I كشـاهد، بينمـا المجموعة II والمجموعة III تستحدث بها السـمية؛ زودت هـذه المجموعـات بـالمحلول الملحـي الفيزيولوجي أولا، بينما زودت حيوانات المجموعة IV والمجموعةV بـ mg/Kg 200 من وزن الجسم بالمستخلص البيتانولي لمدة ثلاث أيام لتستحدث بها السمية باليوم الرابع بجرعة فموية منفـردة (300 mg/Kg) (Victoria وآخـرون، 2004) مـن hydrazine sulfate (HD sulfate) وacetylhydrazide (AcHD). تقتل الحيوانات بعد 16، 24 ساعة لأجل الدراسات النسيجية والمعايرات البيوكيميائية.

3.2 المعايرات البيوكيميائية

- أمكن تقدير الأكسدة الليبيدية عن طريق تقدير المواد النشطة (TBARS) لحمض Thiobarbituric اعتمادا على طريقة Ohkawa وآخرون (1979) باستعمال القياسي -1.1.3.3 tetraethoxypropane.
- لقياس مؤشرات السمية الكبدية تم معـايرة alanine amino transferase (ALT) و aspartate amino transferase (AST) و alkaline phosphatase (ALP) باستعمال مشخصات الـkit.
- تم قياس نشاط الـcatalase (CAT) وفقا لطريقة Aebi (1974) باستعمال H_2O_2 كمادة تفاعل، لتعبر وحدة الـcatalase عن 1 µM من H_2O_2 المفكك بكل دقيقة.
- تم قياس نشاط Superoxide dismutase (CuZn SOD) و (Mn SOD) وفقـا لطريقـة Flohé وOhing (1984) انطلاقا من اختزال السيتوكروم C بواسطة ($O^{\circ -}_2$) والتي تقرأ علـى 550 nm،ويعبرعن النشاط الأنزيمي بالوحدة لكل mg بروتين لتحسب الوحدة بنـاء علـى كميـة الأنزيم اللازمة لتثبيط 50 % من الاختزال السيتوكرومي.
- لتقدير كل من الـ ubiquinol (UQ-9) و(UQ-10) ثم استخلاص كل منهما فـي ml 4 مـن الـhexane، وبعد الطرد المركزي تجفف الطبقة العليا تحت الـN_2 لتستقبل بالميثانول-إيثانول (70:30v/v) بحجم نهائي 1 ml ثم تحقن هذه العينات بالـ HPLC وتسـتعملUQ-10, UQ- 9 القياسين لأجل التقدير (Lang وآخرون، 1986) بإستعمال C18 HPLC. Column, Supelco, Bellefond, P.A.

1.3.2 معايرات النظام الجلوتاتيوني

- تم قياس الجلوتاتيون GSH بالمجنس الكبدي والميتوكوندريا وفقا لطريقة Ellman (1959).

- نشاط أنزيم glutathione peroxidase (GPx) تم تقـديره وفقـا لطريقـة Lawerence وBurk (1976) باستعمال cumen hydroperoxide كمادة تفاعل، ويعبر عن الوحدة بالـ µM الخاص بالـ GSH المؤكسد خلال دقيقة لكل mg من البروتين.
- تم تقدير البروتين وفقا لطريقة Lowry وآخرون (1951) باستعمال الألبومين المصلي قياسيا.

3. الأثر الوقائي للمركبات الفلافوتيدية المعزولة من *C. fuscatum in vitro* على العزلات الكبدية المعاملة بالـhydrazine

1.3 معالجة المزارع الخاوية

بعد شفط بيئة الـ RMPI عولجت العزلات الكبديـة بالمركبـات الفلافونيديـة تحـت الاختبـار (10-50 µM) مذابة بالـDMSO (10 µM) بحجم نهائي 0.1 %، واستحدثت السمية بالهيدرازين فـي صورة hydrazine sulfate (100 µM) مذابا بالبيئة التجريبية، حضن المجموع لمدة 10 ساعات لغايـة المعايرات اللاحقة واستعملت الـsilymarin (4µM) كشاهد موجب.

بالنسبة لتجارب دراسات الفعل التثبيطي للفلافونيدات عولجت الخلايا الكبدية بالـRMP (10 µM) أو بالـINH (50 mM) مذابة في DMSO حجم نهـائي 0.1 % (Raucy وآخـرون،2003) تتـرك الشواهد دون معالجة وتضاف الفالفونيدات بتركيز (0.5-50 µM).تستغرق المعاملة 24 سـاعة، تفـرد الخلايا بمحلول التجنيس وتثفل قبل إخضاعها لتحاليل Western blot.

2.3 المعايرات البيوكيميائية

1.2.3 قياس الـ TBARS بالعزلات الكبدية

قدرت الأكسدة الليبيدية لكل من الشواهد والشواهد الموجبة والمعاملات بطريقة Ohkawa وآخرون (1979)، ففي نهاية المعاملات السابقة (HD + فلافونيد)، تغسل الخلايا وتنـزل بـ1 ml (BPS) لتتبع بـL µ 100 من % 10 DMSO لأجل التثبيت و 650 µL من % 0.5 TBA في % 20 من حمـض الخليك الثلجي (v/v) (pH 3,5) ثم تحضن لفترة 30 دقيقة على 80 م°.وبعد التبريد تقرأ على 532 nm على SpectraMAX Plus 190 microplate reader ويعبر عن النتائج TBARS/ mg protein.

2.2.3 قياس تسرب الـ Lactate dehydrogenase (LDH)

تم قياس مدى تسرب الـ LDH مطيافيا اعتمادا على أكسدة الـ NADH على340 nm بالوسط المزرعي (Moldeeus وآخرون، 1978).

3.2.3 قياس نشاط الـ succinic dehydrogenase (SDH)

قدر نشاط الـ SDH مطيافيا وفقا لطريقة Bergmeyer وآخرون (1978) باسـتعمال الكواشـف التجارية.

4.2.3 معايرات النظام الجلوتاتيوني بالعزلات الكبدية

أمكن معايرة كل من الـ GSH والـ GR والـ GST بـ 96 بئر خلوي باستعمال SpectraMAX plus 190 microplate reader . إذ قدر الـ GST وفقا لطريقة Alin وآخرون (1985) اعتمادا على CDNB كمادة تفاعل إلكتروفيلية ترتبط مع الـ GSH بمساهمة هذا الإنزيم معطية معقدا ملونا (-GSHمادة التفاعل) يقرأ عند 340 nm. وقيس الـ GSH اعتمادا على الطريقة الأنزيمية في وجود الـ GRوكاشف (5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic) Ellman. ونسبت النتائج مائويا إلى الشواهد (Ellman ، 1959)؛ وتمت معايرة نشاط الـ GR وفقا لطريقة (Carlberg وMannervick، 1985) وعبر عن هذا النشاط بـ mU/ mg protein الخلوي (كل وحدة تعبر عن النشاط المقابل لأكسدة 1 nM من NADPH في كل دقيقة).

التحاليل الإحصائية

أدرجت النتائج كمتوسط ± S.D.. ولأجل المقارنة بين متوسطين تم إستخدام إختبار Student' t ، ولأجل المقارنة بين عدد أكبر من المتوسطات تم إستخدام تحليل التباين.بالنسب للدراسات *in vitro* يعبر عن النتائج لثلاث مكررات من المزارع الخلوية لثلاث جرذان

حسبت النسب الوقائية للمستخلص البيتانولي لكافة هذه المؤشرات وفقا للمعادلة الآتية:

$A_{HD} - A_S / A_H - A_C \times 100$ حيث

A_{HD} : قيم HD ، A_S : قيم العينة، A_C : قيم الشاهد

4 اثر المركبات الفلافونيدية على الوظائف الميتوكوندرية *in vitro*

1.4 اختبارمعدل الاستهلاك الأكسجيني

أمكن تحديد معدل الاستهلاك الأوكسجيني اعتمادا على الإلكترود المجهري (Hanasatech, Clark-ADP) حيث أجريت كل تجربة كما يلي: يحضن قسم من المعلق الميتوكوندري 1 mg/ ml مـع أودون المركب تحت الاختبار لمدة 1 دقيقة على درجة 25°م بـ 1000 µL من المنظم التنفسي ويقدر إستهلاك

الـ O_2 فور إضافة المادة (الطور2). أماالطور 3 فيقدر بإضافة الـ ADP بينما يقاس الطـور 4 غثـر تحول الـ ADP إلى ATP مع أو دون المثبطات.

إختبار نشاط المعقد 1 الميتوكوندري

يستعمل بهذه التجربة الـ rotenone كمثبط مرجعي للمعقد I، تنطلق التجربة بإضافة pyruvate/malate (10 µl). و لإنطلاق الطور التنفسي الثالث يضاف 200µM من الـ ADP . يقدر معدل تثبيط الطـور2 (نشاط المعقدI) عند كل تركيز مقارنة بالشاهد.

إختبار نشاط المعقدات II – III و V

يحضن 1 mg/ml من المعلق الميتوكوندري بـ 1000 µl مـن المـنظم التنفسـي مـع 10 mM مـن الـ rotenone ويضاف 10 mM من الـ succinate ليحسب معدل الإستهلاك الأوكسيجيني (الطـور2). لأجل إتمام انطلاق طور النشاط التنفسي (الطور3) فإن 200 µM من الـ ADP تضاف إلـى الخليـة. وقبيل تحول كافة الـ ADP إلى ATP يضاف 10 mM من الـ malonate و 1µM مـن antimycin A (كشاهد ومثبط للمعقد III) أو المركب الفلافونيدي (8C2) : ليتيولين جليكوليزيدي، k 4: keampferol، III ch: apigenin ، ويقاس الطور4. ويضاف كل من antimycin كمثبط مرجعي للمعقدII وإثر تثبيط المعقـدIII فـإن 5mM مـن الـ ascorbate وmM 1 مـن الـ -N, N, N', N'-tetramethyl-p phenylenediamin (TMPD) تضاف لأجل تنشيط المسرى الحيوي. تم إجراء كافة الاختبارات علـى مطيافية 530 nm بخلية تضم مثبط نوعي لكل معقد (Rustin و آخرون، 1994). قيست هذه المؤشرات بناء على ما يلي:

- المعدل التنفسي: nM O_2/ min/mg protein
- RCR: الطور3/الطور4
- P/O : نسبة الـ ADP المستعمل من طرف الـ O_2 المستهلك بالطور3

2.4 قياس الجهد الغشائي

أمكن قياس الجهد الغشائي اعتمادا على لمعانيـة 123 rhodamine (Emauset وآخـرون 1982) على الموجات الانبعاثية 503 nm و 527 على التوالي. حضنت الميتوكوندريا (0,5 mg/ml) فـي 1,8 ml من المنظم، في وجود 2 µM من rotenone و 0,3 µM من 123 rhodamine ، يضاف بعد 30ثا 6 µM من الـ succinate وفورانطلاق الجهد الغشائي تضاف المادة النباتية إلـى الوسـط بتراكيـز مـابين (10^{-9} M و 10^{-4} M) لتضاف هـذه المـادة أو المـادة المنشـطة للجهـد الغشـائي (testosterone, progesteron, cholestanol, hydrocholestanol (Skula chev ، 1998).

تـم القيـاس باسـتخدام جهـاز photometer fluorescence Perkin Elmer Life Sciences Wilbad, Germany

3.4 معايرة التضخم الميتوكوندري (swelling)

يتم تحديد التضخم الميتوكوندري اعتمادا على تغيرات الامتصاصية على المعلق علـى 540 nm. حيث تحضن 1 mg/ml من الميتوكوندريا على حجم نهائي 1,8 ml من المنظم C (sucrose 250 mM، 5 mM KH_2PO_4، pH 7.2) وفي وجود الـ 6 mM من الـ succinate على درجة 25°م بعد أن يكون قد أضيف إلى المنظم مادة Rotenone (2 µM)، فورا قبيل الشروع في التجربة.

كما أمكن قياس هذا التضخم الميتوكوندري عند الظروف اللاطاقوية. حيث حضنت مسبقا mg 1 مـن الميتوكوندريا لمدة 1 دقيقة بالمنظم Tris المتشكل مـن (150 mM)،sucrose (5 mM)،Tris (0,5 µg) من rotenone و(0,5 µg/ml) من antimycin، pH 7.4 على درجة 25°م قبيل إضافة 100 µM $CaCl_2$ لينطلق حدوث التضخم بعد 4 دقائق من إضافة المركـب الفلافونيـدي (Santos وآخـرون، 1998؛ Compton، 1999).

4.4 تأثير المركبات الفلافونيدية على الإجهاد التأكسدي بالميتوكوندريا

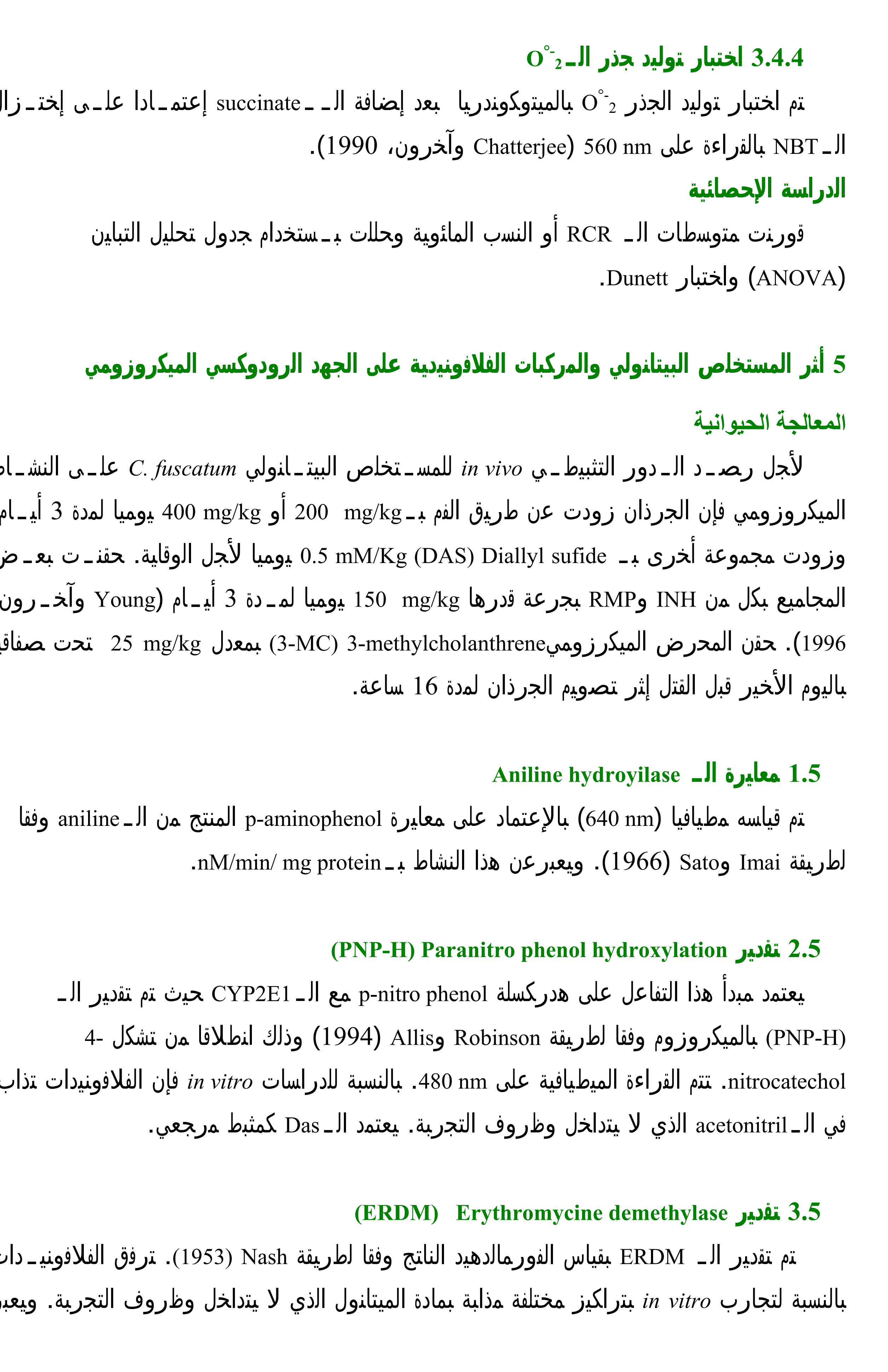
1.4.4 الأسرالجذري للمركبات الفلافونيدية

إن المقدرة الأسرية لكل مركب فلافونيدي أمكن تحديدها باستعمال الجـذر الثابـت diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH°) حيث تضاف المواد تحت الإختبار إلى محلول الايثانول لـ100 µM مـن DPPH ويتتبع التناقص في الامتصاصية وفقا للزمن على 515 nm؛ وقدر الـ IC_{50} المعبر عن التركيز الموافق لانخفاض 50% من DPPH (Robak وآخرون، 1988؛Hanasat وآخرون،1994).

2.4.4 معايرة الأكسدة اللبيدية بالميتوكوندريا

استقبلت الميتوكوندريا على 0.9 % من الـ NaCl (0,2 mg/ml) و حضنت بعدئذ بحجم نهـائي 1 ml في وجود Fe^{3+}/Fe^{2+} (50 µM/ 50µM) لمدة 5 دقائق. يوقف هذا التفاعل بـ ـ ـ 1 ml مـن 3% TCA و 1,5 ml من 1% TBA ثم يسخن مخلوط التفاعل على 100°م لمدة 30 دقيقة ويبـرد لمـدة 5 دقائق، ثم يقرأ الطافي علـى 530 nm، يعبـر عـن النتـائج nM/ mg protein TBARS. (Lahouel وآخرون، 2004).

وحسب البروتين الميتوكوندري وفقا لطريقة (Lowry، 1951). وتم إجراء كافة الاختبارات الميتوكوندرية على درجة 25°م.



3.4.4 اختبار توليد جذر الـ$O^{°-}_2$

تم اختبار توليد الجذر $O^{°-}_2$ بالميتوكوندريا بعد إضافة الـ succinate إعتمادا على إختزال الـ NBT بالقراءة على 560 nm (Chatterjee وآخرون، 1990).

الدراسة الإحصائية

قورنت متوسطات الـ RCR أو النسب المائوية وحللت بـإستخدام جدول تحليل التباين (ANOVA) واختبار Dunett.

5 أثر المستخلص البيتانولي والمركبات الفلافونيدية على الجهد الرودوكسي الميكروزومي

المعالجة الحيوانية

لأجل رصد الدور التثبيطي *in vivo* للمستخلص البيتانولي *C. fuscatum* على النشاط الميكروزومي فإن الجرذان زودت عن طريق الفم بـ 200 mg/kg أو 400 mg/kg يوميا لمدة 3 أيام، وزودت مجموعة أخرى بـ Diallyl sufide (DAS) 0.5 mM/Kg يوميا لأجل الوقاية. حقنت بعض المجاميع بكل من INH وRMP بجرعة قدرها 150 mg/kg يوميا لمدة 3 أيام (Young وآخرون، 1996). حقن المحرض الميكرزومي 3-methylcholanthrene (3-MC) بمعدل 25 mg/kg تحت صفاقيا باليوم الأخير قبل القتل إثر تصويم الجرذان لمدة 16 ساعة.

1.5 معايرة الـ Aniline hydroyilase

تم قياسه مطيافيا (640 nm) بالإعتماد على معايرة p-aminophenol المنتج من الـ aniline وفقا لطريقة Imai وSatog (1966). ويعبرعن هذا النشاط بـ nM/min/ mg protein.

2.5 تقدير Paranitro phenol hydroxylation (PNP-H)

يعتمد مبدأ هذا التفاعل على هدركسلة p-nitro phenol مع الـ CYP2E1 حيث تم تقدير الـ (PNP-H) بالميكروزوم وفقا لطريقة Robinson وAllis (1994) وذلك انطلاقا من تشكل 4-nitrocatechol. تتم القراءة الميطيافية على 480 nm. بالنسبة للدراسات *in vitro* فإن الفلافونيدات تذاب في الـ acetonitril الذي لا يتداخل وظروف التجربة. يعتمد الـ Das كمثبط مرجعي.

3.5 تقدير Erythromycine demethylase (ERDM)

تم تقدير الـ ERDM بقياس الفورمالدهيد الناتج وفقا لطريقة Nash (1953). ترفق الفلافونيدات بالنسبة لتجارب *in vitro* بتراكيز مختلفة مذابة بمادة الميتانول الذي لا يتداخل وظروف التجربة. ويعبر

عن هذا النشاط بـ nM/min/ mg protein . وتعامل الميكروزومات بـ troleandomycin كمثبط مرجعي ، وتتم القراءة المطيافية على مطايف (UV/Vis *Shimadzu 16001*)

4.5 تحاليل الـ Western Blot

أكّـدت هذه الدراسـة بتجـارب تحاليـل Western blot إذ فصـلت 5µg مـن البـروتين الميكروزومي بـ 7.5 % من SDS- polyacrylamide gel electrophresis و أغشية nitrocellulose بعد تحضينها مع polyclonal antibodyالمضادة لـ rat CYP2E1 أو rat CYP3A4 بعد غسـلها بـالمنظم Tris-saline. تحضن مع goat anti rabbit antibody (Gentest) المقترن بـ horse radish peroxidase و تشخص إرتباطات الأغشية بالأجسام الضدية بعد تحريضـها بـ Chemiluminescence Western-Blotting Detection System Kit.

5.5 معايرة نشاط Epoxide hydrolase (EH)

أمكن قياس نشاط الـ Epoxide hydrolase مطيافيا وذلك بتقـدير معـدل trans-stilbene oxide (TSO) المتناقص على 229 nm (Bradfield وBjedanes، 1984).

عبر عن نتائج هذه الدراسة كنسبة تثبيطية للنشاط الميكروزومي إعتمادا على مايلي: قيم RMP+INH–قيم العينة/ قيم RMP+INH – قيم الشاهد x 100

التحاليل الإحصائية

أدرجت النتائج في متوسط ± S.D. ولأجل المقارنة بين متوسطين تم إستخدام إختبار Student' t ، لأجل المقارنة بين عدد أكبر من المتوسطات تم إستنخدام تحليل التباين.

6 الدراسات الهيماتولوجية

1.6 تقدير مؤشرات النظام الردوكسي بالكريات الحمراء

- تقدير الـ glutathione reductase (GR)

أمكن قياسه بالكريـات الحمـراء وفقـا لـ (Bayoumi وRosalki، 1976) باستـعمال مـن الـ hymolysate ، وقدر النشاط الأنزيمي بدلالة انخفاض الإمتصاصية الناجمة من أكسدة NADPH إلى NADP، معبرا عن هذا النشاط بـ U/g Hb. حيث أن الوحدة تكافئ أكسدة 1 µM من NADPH لكـل دقيقة على 37°م.

- **تقدير الـ glutathione S- transferase (GST)**

أمكن قياس نشاط هذا الأنزيم وفقا لـ (Habig وآخرون، 1974) باستعمال (CDNB) و 100 µM من الـ hymolysate، حيث تكافئ الوحدة كمية الإنـزيم المقتـرن بـ 1µM مـن 5,5' dithiobis-2-nitrobenzoic (CDNB) لكل 1 دقيقة على 37°م.

- **تقدير نشاط الـ glutathione peroxidase (GSH-px)**

يحفز هذا النشاط أكسدة الجلوتاتيون بالـ cumen hydroperoxide في حضـور الـ glutathione reductase والـ NADPH. وقد عبر عنه بالوحدة المكافئة لكمية الإنزيم اللازمة لأكسـدة 1µM مـن NADPH لكل دقيقة على درجة 37°م (Paglia وValentine، 1967).

- **تقديرنشاط الـ glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PD)**

تم تقديرنشاط الـ glucose 6 phosphate dehydrogenase مطيافيا وفقا لطريقة (Brigelius، 1986)

- **تقدير نشاط الـ superoxide dismutase (SOD)**

تم تقدير نشاط هذا الأنزيم باستعمال RAN SOD Kit و50 µL من الـ hymolysate اعتمادا على الطريقة المطيافية التي تعبر عن تثبيط تشكل الـ formazan بواسطة الـ SOD على درجة 37°م ويقرأ هذا النشاط كوحدة لكل غرام هيموجلوبين (Gonzales وآخرون، 1984).

- **تقدير نشاط الـ catalase (CAT)**

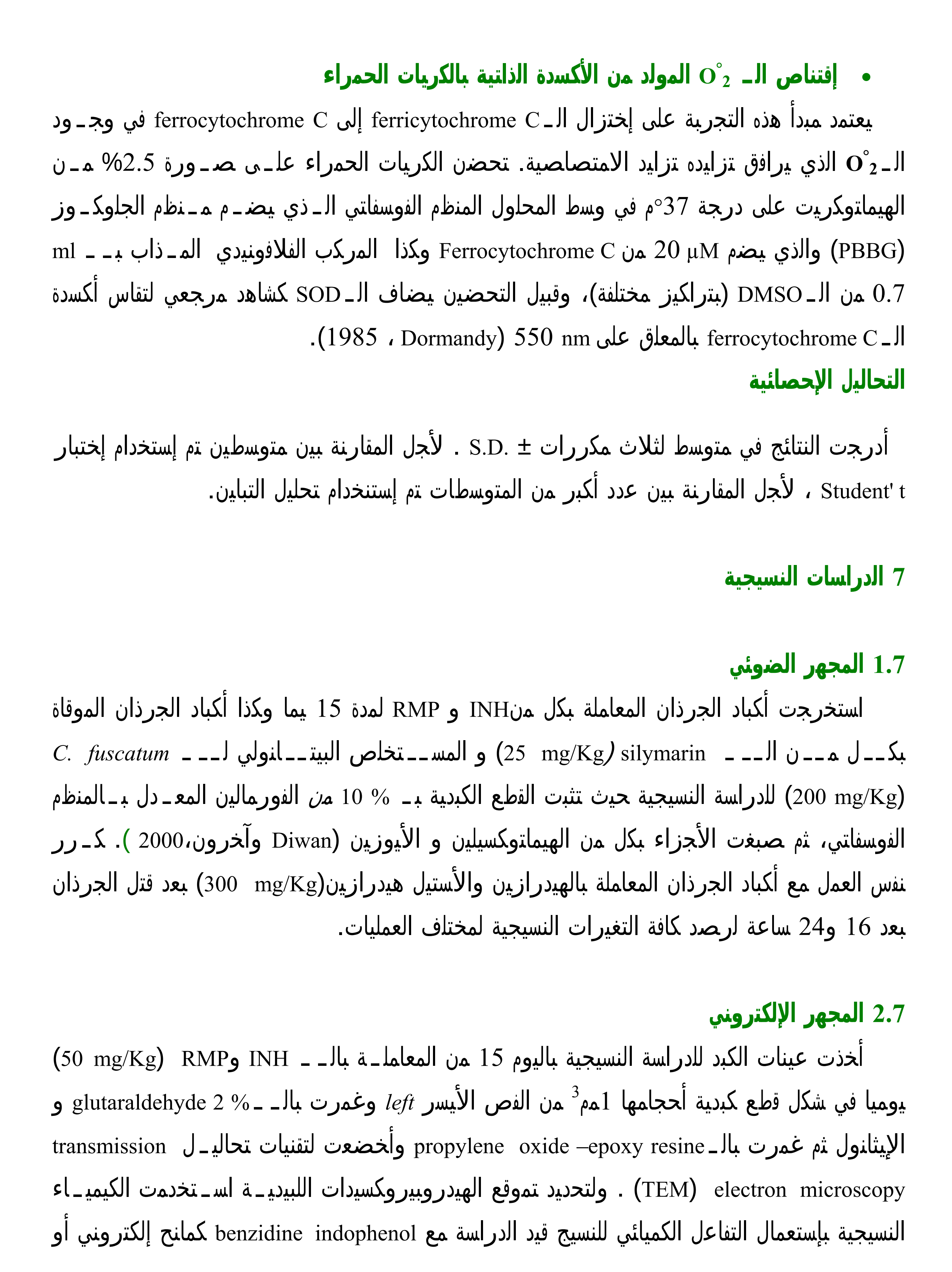
يقاس هذا النشاط كمدى قابلية الكاتالاز بتغييب الـ H_2O_2 بتتبع المطيافية الناجمة عن نقص وغياب الـ H_2O_2 بفضل الكاتالاز. ووحدة النشاط عرفت بأنها كمية الأنزيم المطلوبة لأجل تفكيك الـ H_2O_2 (1µM/ min) على درجة 25 °م و pH 7 . وعبرعن هذا النشاط كوحدة U/mg protein (Aebi، 1974) مستعملا في ذلك 10 µl من الـ hymolysate.

- **تقدير الـ الأكسدة الليبيدية**

أمكن قياس الـ MDA بـ 50 µL من الـ hymolysate وفقا لطريقة (Gavrilov ، 1987).

- **تقدير البروتين كاربونيل بأغشية الكريات الحمراء :**

أمكن قياس الكاربونيل بروتين بالبروتين الغشائي (0.05mg) وفقا لـ (Levine وآخرون، 1990) باستعمال 2.4 dinitrophenyl hydrazine . ويعبر عن النتائج بـ nmol carbonyl/ mg protein.



- **إقتناص الـ $O^{°}_2$ المولد من الأكسدة الذاتية بالكريات الحمراء**

يعتمد مبدأ هذه التجربة على إختزال الـ ferricytochrome C إلى ferrocytochrome C في وجـود الـ$O^{°}_2$ الذي يرافق تزايده تزايد الامتصاصية. تحضن الكريات الحمراء علـى صـورة 2.5% مـن الهيماتوكريت على درجة 37°م في وسط المحلول المنظم الفوسفاتي الـذي يضـم مـنظم الجلوكـوز (PBBG) والذي يضم 20 µM من Ferrocytochrome C وكذا المركب الفلافونيدي المـذاب بـ ml 0.7 من الـ DMSO (بتراكيز مختلفة)، وقبيل التحضين يضاف الـ SOD كشاهد مرجعي لتقاس أكسدة الـ ferrocytochrome C بالمعلق على 550 nm (Dormandy ، 1985).

التحاليل الإحصائية

أدرجت النتائج في متوسط لثلاث مكررات ± S.D. . لأجل المقارنة بين متوسطين تم إستخدام إختبار Student' t ، لأجل المقارنة بين عدد أكبر من المتوسطات تم إستخدام تحليل التباين.

7 الدراسات النسيجية

1.7 المجهر الضوئي

استخرجت أكباد الجرذان المعاملة بكل منINH و RMP لمدة 15 يما وكذا أكباد الجرذان الموقاة بكـل مـن الـ silymarin (25 mg/Kg) و المسـتخلص البيتـانولي لـ *C. fuscatum* (200 mg/Kg) للدراسة النسيجية حيث تثبت القطع الكبدية بـ 10 % *من* الفورمالين المعـدل بـالمنظم الفوسفاتي، ثم صبغت الأجزاء بكل من الهيماتوكسيلين و الأيوزين (Diwan وآخرون،2000). كـرر نفس العمل مع أكباد الجرذان المعاملة بالهيدرازين والأستيل هيدرازين(300 mg/Kg) بعد قتل الجرذان بعد 16 و24 ساعة لرصد كافة التغيرات النسيجية لمختلف العمليات.

2.7 المجهر الإلكتروني

أخذت عينات الكبد للدراسة النسيجية باليوم 15 من المعاملـة بالـ INH وRMP (50 mg/Kg) يوميا في شكل قطع كبدية أحجامها 1مم[3] من الفص الأيسر *left* وغمرت بالـ 2 % glutaraldehyde و الإيثانول ثم غمرت بالـ epoxy resine– propylene oxide وأخضعت لتقنيات تحاليـل transmission electron microscopy (TEM) . ولتحديد تموقع الهيدروبيروكسيدات الليبيديـة اسـتخدمت الكيميـاء النسيجية بإستعمال التفاعل الكيمائي للنسيج قيد الدراسة مع benzidine indophenol كمانح إلكتروني أو

لتحديد الأكسدة الليبيدية بالبنى الدقيقة وفقـا لطريـق tetra methyl benzidine (TMB) كـ chromagen (Thomas وPoznansky، 1990).


النتائج و المناقشة

2- النتائج والمناقشة

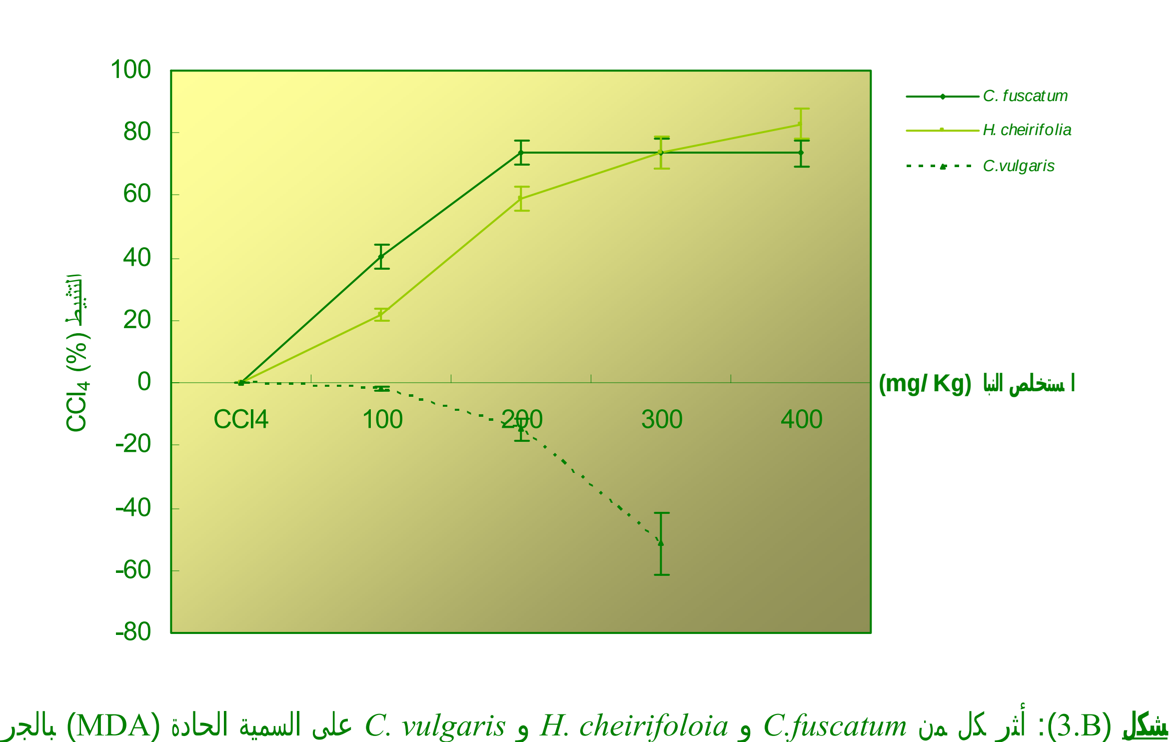
1. إختبارات الفعل المانع للأكسدة

1.1 الأثر الوقائي للمستخلصات البيتانولية لكل من *C. fuscatum* و*H. cheirifolia* و*C. vulgaris* من السمية الحادة المستحدثة بـ CCl_4 لدى الجرذان.

جدول (2.B): الأثر الوقائي لكل من *C. fuscatum* و *H. cheirifolia* و *C. vulgaris* علىالسمية الحادة (MDA) بالجرذان المحرضة بـCCl_4

المستخلص(mg/Kg)	الشاهد [a]	CCl_4	100	200	300	400
C. fuscatum	0.92±8,26	**4.62±62,68	*3.68±40,8	**2.7±22,6	**2.9±22,62	3.2±22,68
H. cheirifolia	0.92±8,26	**4.5±62,68	4.7±50,2	*5.9±44,12	**1.8±22	**2.9±18,5
C. vulgaris	0.92±8,26	**4.5±62,68	4.1±63,7	4.8±70,8	*8.1±90,7	

(a): MDA= nM/100 mg protein
n = 6 ± SD; $P^* < 0.05$; $P^{**} < 0.01$

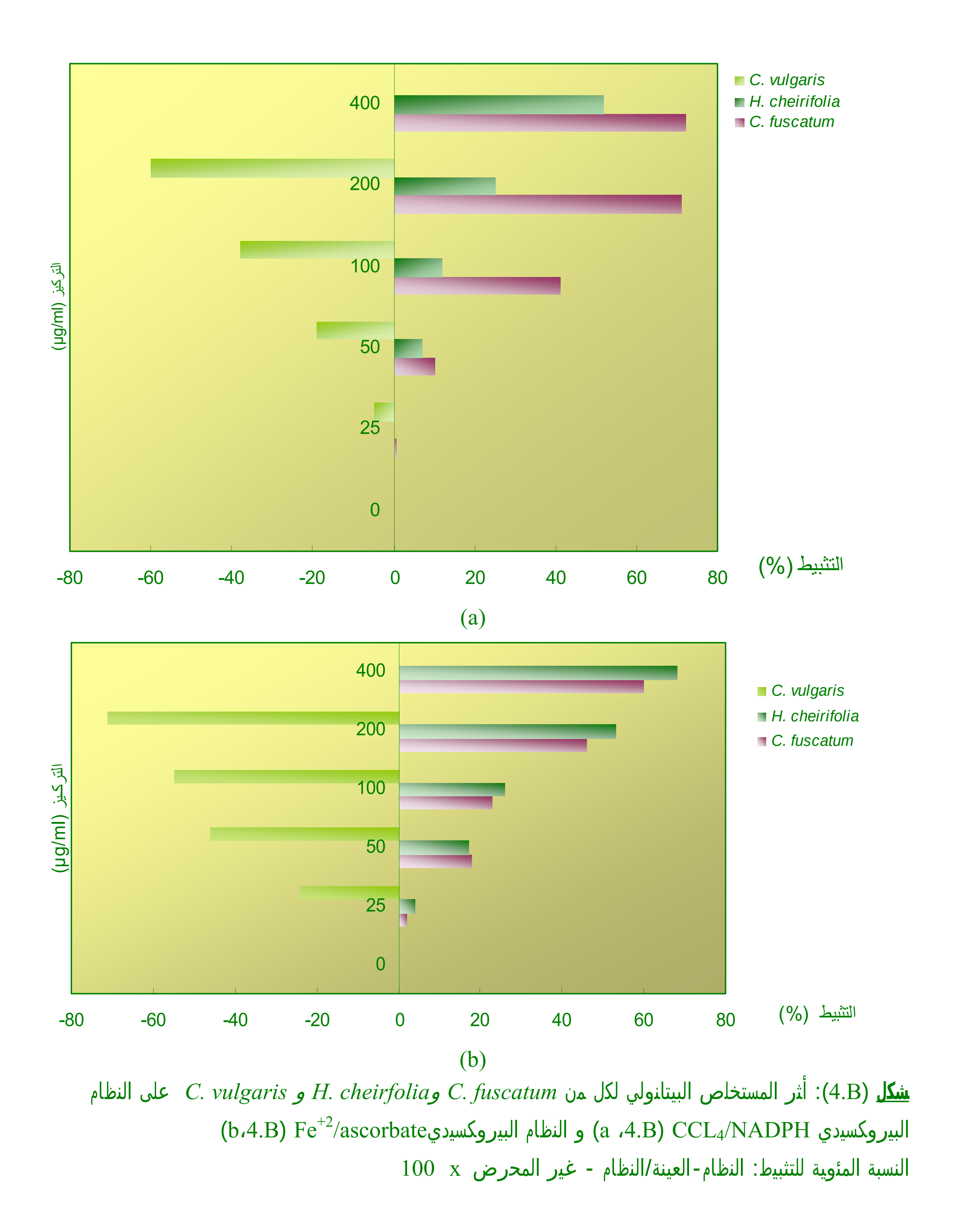


شكل (3.B): أثر كل من *C.fuscatum* و *H. cheirifoloia* و *C. vulgaris* على السمية الحادة (MDA) بالجرذان المحرضة بـ CCl_4

النسبة التثبيطية: CCl4-sample/CCl4-contrôle x100

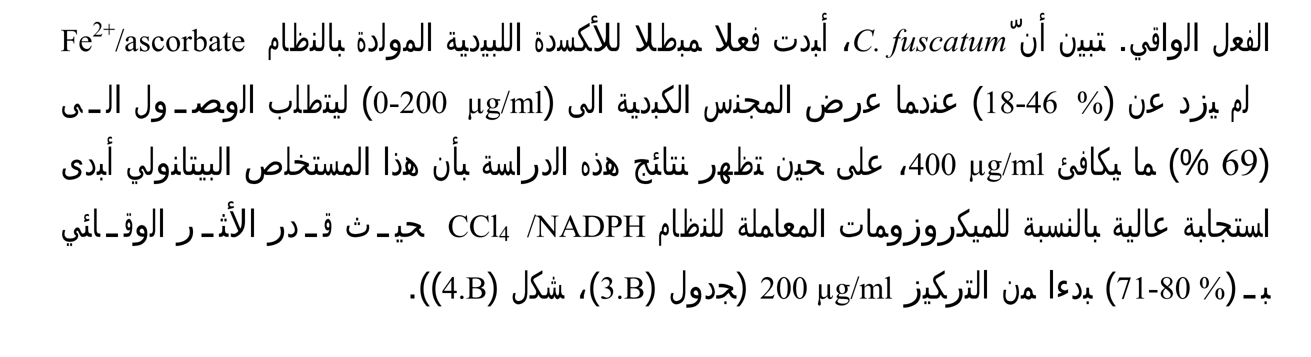
تدلي النتائج المدونة بالجدول (2.B) بأن كلا من *C. fuscatum* ، *H. cheirifolia* قد حـددت مـن الفعل السمي الحاد المحرض لـ CCL_4 لدى الجرذان حيث حـددت الجرعـة 200 mg/Kg كجرعـة استجابية بالنسبة لـ *C. fuscatum* بينما أبدت *H. cheirifolia* فعلا وقائيا (% 83-74) يتزايـد بتزايـد التركيز (200-400 mg/Kg). كما تبدي نتائج هذه الدراسة أن *C. vulgaris* قد ساهمت في زيادة حـدة هذه السمية الشكل (3.B)

2.1 أثرالمستخلص البيتانولي لكل من *C. fuscatum* ،*C. vulgaris* ،*H. cheirifolia* على مختلف الأنظمة البيروكسيدية



شكل (4.B): أثر المستخلص البيتانولي لكل من *C. fuscatum* و*H. cheirfolia* و *C. vulgaris* على النظام البيروكسيدي CCL_4/NADPH (4.B، a) و النظام البيروكسيدي Fe^{+2}/ascorbate (4.B، b)

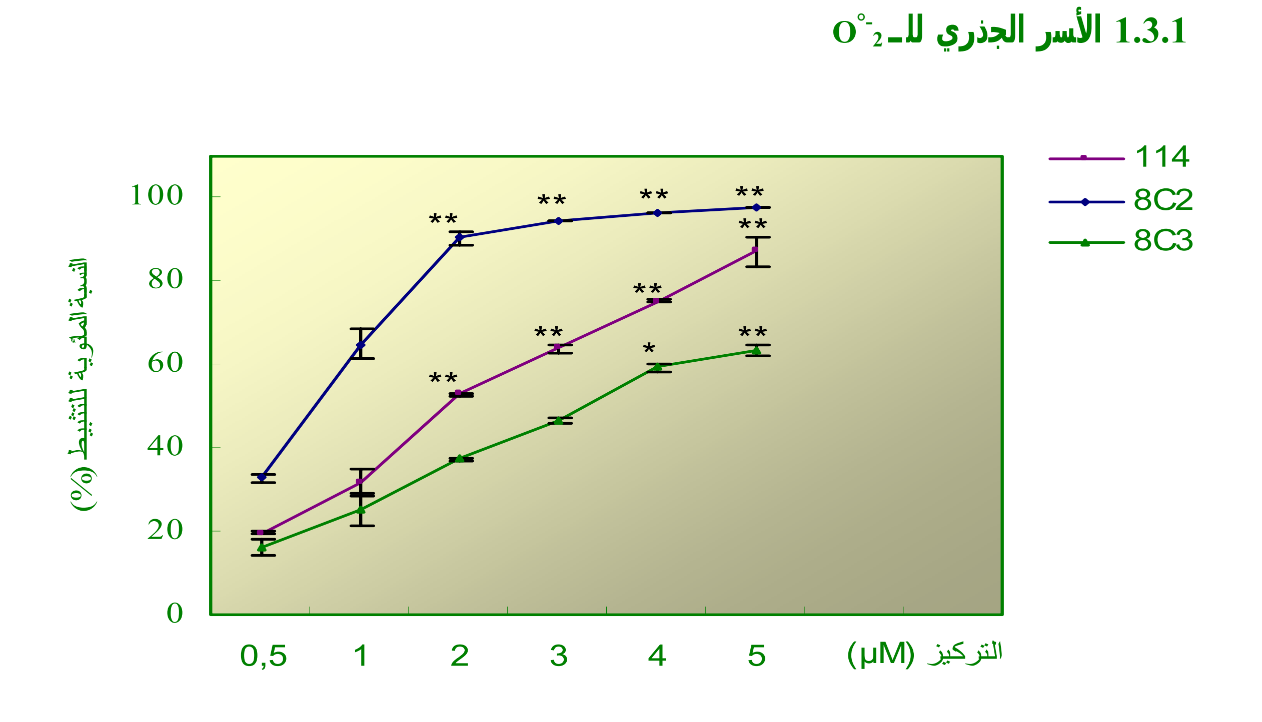
النسبة المئوية للتثبيط: النظام-العينة/النظام - غير المحرض x 100



عند فحص نتائج الفعل الواقي للمستخلصات البيتانولية للنباتات تحـت الدراسـة علـى الجـذور المؤكسدة التي يمكنها أن تولد بمختلف الأنظمة البيروكسيدية بغرض تحديد الآليات المحتملة لتفسير هذا الفعل الواقي. تبين أن *C. fuscatum*، أبدت فعلا مبطلا للأكسدة اللبيدية المولدة بالنظام Fe^{2+}/ascorbate لم يزد عن (18-46 %) عندما عرض المجنس الكبدية الى (0-200 µg/ml) ليتطلب الوصـول الـى (69 %) ما يكافئ 400 µg/ml، على حين تظهر نتائج هذه الدراسة بأن هذا المستخلص البيتانولي أبدى استجابة عالية بالنسبة للميكروزومات المعاملة للنظام NADPH/ CCl_4 حيـث قـدر الأثـر الوقـائي بـ(71-80 %) بدءا من التركيز 200 µg/ml (جدول (3.B)، شكل (4.B)).

3.1 اختبارات الفعل المانع للأكسدة للمركبات الفلافونيدية المعزولة من *C. fuscatum*

1.3.1 الأسر الجذري لـ $O^{\circ-}_2$



شكل (5.B): الأسر الجذري لـ O_2 بالمركبات الفلافونيدية المعزولة من *C. fuscatum*، إختبار luminol

التثبيط (%) : A0-A1/A0x100

0,743=A0

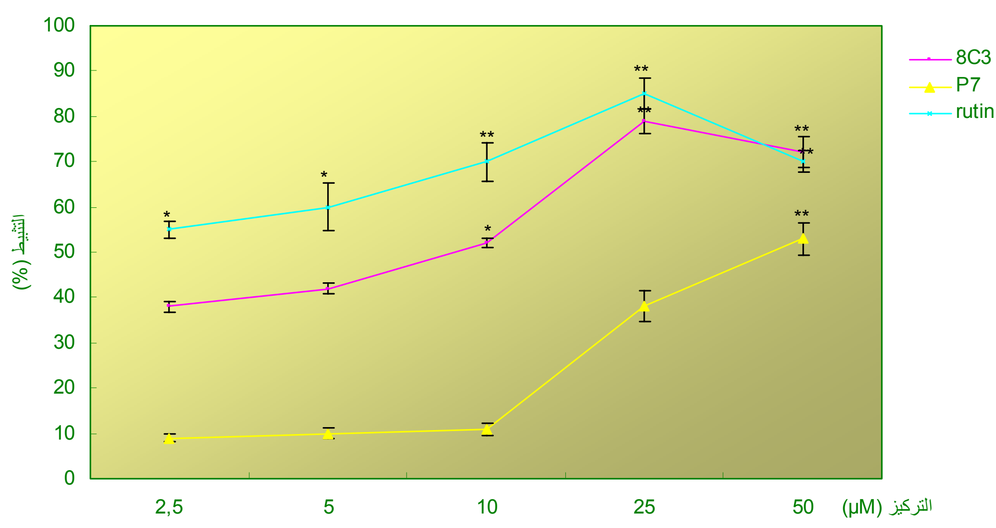
A1 = إمتصاصية المادة تحت الإختبار

n = 3 ± SD; P*<0.05; P**<0.01

الشاهد : SOD

إن إضافة الـ oxidase xanthin إلى كل من الـ luminol و الـ xanthin يحرض إرسالا ضوئيا يتوقف بحضور الـ SOD (330 U/ml) بحيث يعكس توقف الإشارة الضوئية القدرة الأسرية للمركـب تحـت الإختبار. وتدلي هذه الدراسة بأن اللمعانية الكيميائية قد ثبطت بـ% 62 إنطلاقا من 1µM ليصل هـذا الفعل إلى % 83 عند 2µM كجرعة إستجابية بالنسبة لـ 8C2 . ويتزايد معدل تثبيط الإشارة الضـوئية بزيادة التركيز بدءا من 2µM ليصل على % 82 عند 5 µM، بينما ينحصر الفعل الأسـري للـ $O_2^{°-}$ مابين (4-5 µM).

2.3.1 الأسر الجذري لكل من OH° و DPPH°



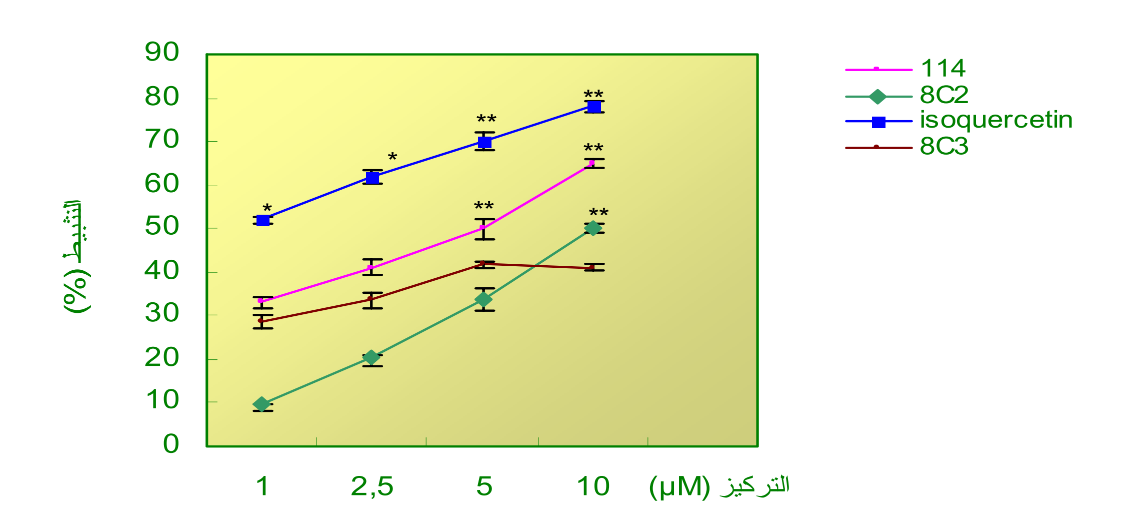
شكل (6.B) الأسـر الجذري لـ OH° بالمركبات الفلافونيدية المعزولة من *C. fuscatum* مقارنة بالـrutin (إختبار deoxyribose)

التثبيط (%) : A_0-A_1/A_0x100

$0,743=A_0$

A_1 = إمتصاصية المادة تحت الإختبار

n = 3 ± SD; P*<0.05; P**<0.01



شكل (7.B) الفعل الآسر لجذر DPPH° بتأثير المركبات الفلافونيدية المعزولة من *C. fuscatum* مقارنة بالـisoquercetin

التثبيط (%) : A_0-A_1/A_0x100

$0,602=A_0$

A_1 = إمتصاصية المادة تحت الإختبار

$n = 3 \pm SD; P^*<0.05; P^{**}<0.01$

- الأسر الجذري لـ °OH

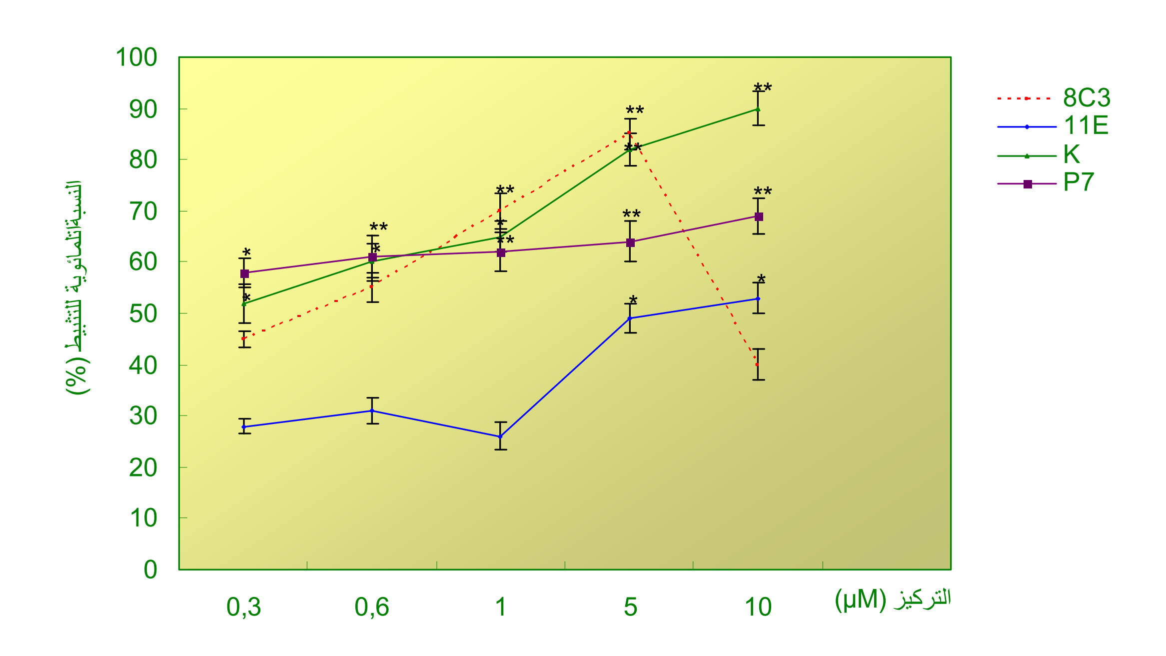
إن الجذر الهيدروكسيلي والمولّد بالنظام Fenton يعبرعن أسره بزوال deoxyribose الذي يترجم بانخفاض الامتصاصية على 532 nm. ويوضح الشكل (6.B) بأن المركبP7 قد تعذرعليه اقتناص هذا الجذر عند المجال التركيزي (2.5-50 µM) حيث لم يثبط زوال deoxyribose الاّ بمقدار 42 % على حين أبدى المركبا 8C3 استجابة مرموقة إذ حقق فعلا تثبيطيا بدءا من التركيز 10 µM و هو يقارب بذلك الفعل الآسر للشاهد المرجعي (rutin). والملفت للنظر أن هذين المركبين ينخفض فعلهما الأسري بعد التركيز 25 µM.

- الأسر الجذري لـ °DPPH

تمتص الصورة الجذرية لـ DPPH° لونيا على 515 nm، واعتمد انخفاض هذه الامتصاصية مقياسا لفعالية الأسر الجذري، وقد أبدت النتائج الملخصة بالشكل (7.B) بأن المركب 114 قد تصدر هذا الفعل حيث أبدى فعلا آسرا (> 50 %) لجذرDPPH° بدءا من التركيز 5 µM وحقق جرعة استجابية عند 10 µM (65 %) وعقبه في التأثير الآسر لجذرDPPH° المركب8C2 الذي تمكن من التقاط الجذرDPPH° انطلاقا من التركيز 10 µM ليحقق تثبيطا قدره (50 %) ، وتعذر على المركب8C3

تحقيق هذا عند مجال التركيز تحت الدراسة.ويبدو أن المركب المرجعي (isoquercitrin) قد حقق فعلا آسرا إنطلاقا من التركيز 1µM .

3.3.1 النشاط المخلبي للمركبات الفلافونيدية



شكل (8.B) الدور المخلب للمركبات الفلافونيدية المعزولة من *C. fuscatum* (المعقد Fe^{2+}/ Ferrozine) مقارنة بالـ kaempferol (K)

التثبيط (%) : A_0-A_1/A_0x100

$0,169=A_0$

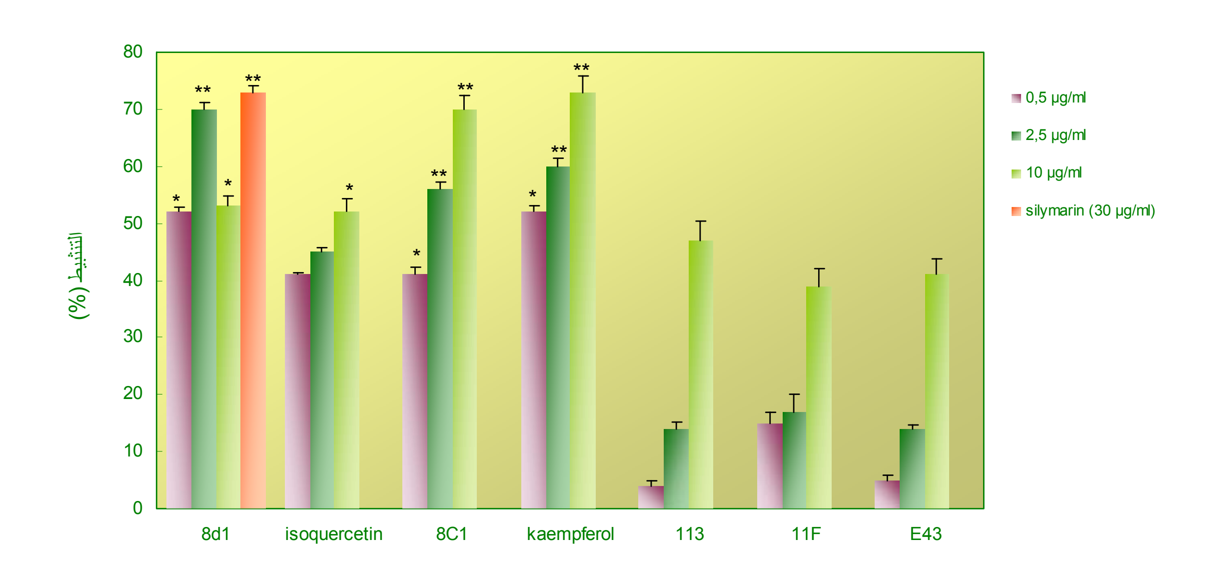
A_1 = إمتصاصية المادة تحت الإختبار

$n = 3 \pm SD; P^*<0.05; P^{**}<0.01$

إن اختبار مدى تمكن المركبات الفلافونيدية من مخلبة أيون الحديدوز عن طريـق تثبـيط معقـد Fe^{2+}-ferosine والتي يستدل عليها بمدى انخفاض الامتصاصية يلخصها الشكل (8.B) حيث يظهر بأن المركب 8C3 تمكن من مخلبة أيون الحديدوز عند تراكيز منخفضة بدءا مـن 0.6 µM ليحقـق فعـلا ممخلبا يزيد عن 50 %، واعتبرالتركيز 5 µM التركيز الأمثل الذي حقق مخلبة قدرها 85 % ليـنخفض بعدئذ هذا الأثر بزيادة التركيز. وسجل بأن التراكيـز الأعلـى تـنعكس بالفعـل المؤكسـد (زيـادة الامتصاصية). وتدلي نتائج هذه الدراسة أيضا المدونة بالشكل (8.B) بـأن المـركبين P7، K، قـد استجابا بشكل متفاوت للفعل المخلبي لأيون الحديدوز، حيث أبدى المركب P7 فعلا مخلبيـا واضـحا تدرج بتدرج التركيز بدءا من 0.3 µM (58 %) الى غاية 10 µM (63%). وقد حقق المركب K الذي

اعتبرشاهدا مرجعيا نفس السلوك المخلبي المتزايد بتزايد التدرج عند تركيز ينطلق من μM 0.3. وقـد تعذر على المركب 11E تحقيق هذا الفعل المخلبي.

4.3.1 الدورالتثبيطي للأكسدة اللبيدية



(a)

(b)

شكل (9.B): أثر المركبات الفلافونيدية المعزولة من *C.fuscatum* على الأكسدة اللبيدية المحرضة *in vitro* بالنظام Fe^{2+}/ascorbate (9.B، a) و النظام CCl_4/ NADPH (9.B، b)

التثبيط (%) : A_0-A_1/A_0x100

1,317=A_0

A_1 = إمتصاصية المادة تحت الإختبار

$n = 3 \pm SD; P^*<0.05; P^{**}<0.01$

إن اختبار الدور المانع للأكسدة الليبيدية المولدة بميكروزومـات الجـرذان *in vitro* والمسـتحدثة بالنظامين Fe^{2+}/ascorbate وCCl_4/NADPH بغرض تحديد آليات فعـل المركبـات المعزولـة مـن *C. fuscatum* وغير المحددة بنيويا بشكل نهائي يلخصه الشكل (9.B ، a وb) موضحا بأن المـركبين 8D1 وisoquercitrin قد استجابا للنظامين معا وبنسب متفاوتة، الاّ أن هذا الأثر كان أبلغ بالنسبة للنظام CCl_4/NADPH حيث حقق isoquercitrin فعـلا تثبيطيـا (70 %) للأكسـدة الليبيديـة المحرضـة بـCCl_4/NADPH عنـد مجـال (2.5-10 µg/ml). ويظهـر أن الأكسـدة الليبيديـة المحرضـة بـFe^{2+}/ascorbate يمكن ابطالها بالتراكيز (0.5-10 µg/ml) من المركب k الذي حقق فعلا قدره (52-73 %) (شكل9.B، a). وتطلبت باقي المركبات 113، 11F تراكيز أكبر لتحقيق ذلك على نفس النظـام ، بينما استجاب المركبE43 للنظام CCl_4/NADPH ولكن تطلب ذلك تراكيز تفوق 10 µg/ml .ما يمكن رصده هنا هو أن رفع التركيز عن 10 µg/ml بالنسبة للمركب 8D1 يخفـض مـن الفعـل التثبيطـي للأكسدة الليبيدية المستحدثة بـFe^{2+}/ascorbate (شكل9.B ، a وb).

المناقـشة

إن التراكيز المحدودة من الجذور الحرة (ROS) لا غنى عنها ، حيث أنّهـا تـؤمن العديـد مـن الفعاليات الفيزيولوجية كما هو الحال في الاستجابات المناعية، الالتصاق الخلوي ، المـوت المبـرمج، الالتهابات الميتابوليزمية والشيخوخة. قد يتسبب الاستيعاب المتتابع للالكترونات لجزيئة الاكسجين فـي انتاج العديد من الـ (ROS) حيث يؤدي استقبال الكترون واحد الى تكوين انيون ما فـوق الاكسـجين ($O^{\circ-}_2$) (Halliwell، 1994) وذلك بفعل اثر الاشعاع التأيني أو كنتيجة لهدم xanthine الـى حمـض اليوريك، وكذا خلال فعاليات البلعمة، كما قد يصاحب حالات ارتباط الـ O_2 بـHb أو الميوجلـوبين (Pietta واخرون، 1996). ولقد اشار Valko وآخرون (2006) بان 2 % من 10^{12} منO_2 المستهلكة من طرف الخلية يمكنها أن تتسرب يوميا لتشكل قاعدة استقطاب بروتوني لأعطاء جذرhydroperoxyl (HO°_2). ويمكـــن لمعظـــم الانظمـــة البيولوجيـــة الانزيميـــة مثـــل diaminoxidase وglucollate oxydase وكذا دورات الـ redox عبر المسارات السيتوكرومية (الاحمـاض الدهنيـة، xenobiotic) وفعاليات البلعمة والسلاسل التنفسية أن تساهم في انتاج الـH_2O_2 والذي يـنظم انزيميـا بتدخل كل من الـcatalase والـperoxidase (Halliwell وGulteridje، 1989). بالرغم من أن H_2O_2 يماثل الـ $O^{-\circ}_2$ في كونه اقل فعالية عبر المسارات *in vivo* فإنه يبدي انجذابا ملحوظا لمجاميع الثيـول ويعبر بيسر الأغشية؛ ويتفاقم هذا الخطر في وجود كل من Fe^{2+} وCu^{2+} ليمنح الجذر النشط OH° عبر تفاعلات Fenton اوHarber Weiss (Harber وWeiss، 1934). إن هذا الجذر (OH°) ذو تخصـص نوعي لمواقع جزئية معينة، ولوقف هذا الاثر من الغزو الجذري يمكن أن يتم ذلك عبر منـع التوليـد بالمسارات المعدنية (الاثر المخلب للأيونات ثنائية الرابطة)، أو بالتباعد الجزيئات المخربة بالـOH°.

فتنوع مصادر تشكل الجذور الحرة يقتضي تقصي آليات الفعل، ولذا تتم دراسـة اثـر المستخلصـات البيتانولية للنباتات تحت الدراسة وكذا المركبات الفلافونيدية المعزولة بغية معادلة أو أسر هذه الجذور وازالتها، حيث أدلى Halliwell وGutteridje (1989) بان الفعل المضاد والمانع للأكسـدة لعديـدات الفينول يمكن ان يحدث وفقا لما يلي :

1- منع تشكل الانواع الاكسجينة النشطة (ROS) عن طريق تثبيط الانزيمات مثل xanthine oxidase، protein kinase C، cyclooxygenase وlipooxygenase

- السلوك الممخاب للمعادن.
- اسر والتقاط الجذور الاكسجينية النشطة (ROS).
- دعم النظام المضاد للأكسدة.

إن اختبار الفعل التثبيطي للمستخلصات البيتانولية على الأكسدة اللبيدية المحرضة بمختلف الانظمة بغية محاولة التقرب من الآلية المتوقعة لإحداث هذا التثبيط، أدلت بأن مستخلصي كل من *C. fuscatum* و *H. cheirifolia* قد قلل من تراكم البيروكسيدات المولدة بكلى النظامين Fe^{2+}/ascorbate وكذا CCL_4/ NADPH وكان هذا الأثر بنسب متفاوتة حيث أبدى المستخلص البيتانولي *C. fuscatum* إستجابة عالية للنظام CCL_4/ NADPH (80%) بدءا من التركيز 200 µg/ml. على حين بقي المستخلص البيتـانولي لـ *C. vulgaris* عاجزا عن تحقيق أية وقاية للميكروزومات المعرضة لكلى النظامين، بل وجد بـأن معدلات الـ MDA المعبرة عن تراكم البيروكسيدات قد ارتفعت عند تعريض الميكروزومات الى هذا المستخلص. إن هذه الحقائق المنتقاة من الدراسات *in vitro* تؤكدها الدراسات *in vivo* عندما عومات الحيوانات مسبقا بتراكيز عدة من المستخلصات البيتانولية قبيل إخضاعها لجرعة حـادة مـن CCl_4 ، حيث تبين بأن *C. fuscatum* قد حددت هذا الفعل السمي الحاد عند جرعة إسـتجابيه قـدرت بـ 200mg/kg ، وتطلبت*H. cheirifolia* (200- 400 mg/kg) للحد من سمية الـ CCl_4 على حين نجد أن الجرذان المعالجة مسبقا بـ *C. vulgaris* قد أبدت أعراضا غريبة تمثلت في حدوث إسـهال، تـورم جلدي وسقوط الشعر، وموت لبعض الجرذان خاصة بعد احداث السمية الحادة بـ CCl_4 أي أن هـذه النبتة سلكت مسلكا سميا بدلا من المسلك الوقائي المرجو. وبفحص دراسات الآخرين وجدنا بأن هـذا يتفق الى حد بعيد مع مـا اشـار إليـه Barth وآخـرون (2002) مـن خـلال الدراسـات *in vitro* للميكروزومات المعاملة بـ *C. vulgaris* وCCl_4 بغية تقصي الأثر الوقائي فوجد أن التراكيز الأكبر من 100 µg/ ml تحرض السمية بدلا من الوقاية.. واشار Diwan وآخرون (2000)، بأن مادة الصابونين وهي أحد مكونات *C. vulgaris*، حددت الـ LD_{50} بها بـ 200 mg/kg . وأشارت دراسـات (Adam وآخرون، 2001) بأن إغتذاء جرذان الـ *Wistar* بـالخليط الغـذائي (10% C. *vulgaris* و 10% *Cassia sanna*) لمدة أسابيع أدى إلى خفض الأوزان، ، سمية كبدية ، أنيميا هيبوكروميـة وارتفـاع معدلات ALT وAST .

إن هذه الاختبارات الأولية تسببت في استبعاد *C. vulgaris* للدراسات الكيميائية مادامت بيولوجيا تهدد بالسمية بينما رشحت *C. fuscatum* التي أبدى مستخلصها البيتانولي فعلا مانعا للأكسـدة عبـر مختلف آليات الإلتقاط الجذري ، للحصر الكيميائي والتنقيب على الجزيئات الفعالـة وتوظيفهـا فـي الدراسة المتوخاة للدور الوقائي من الآثار الجانبية لمضـادات السـل بمقارنتهـا بـ *H. cheirifolia* المعروفة المركبات والتي درست كيميائيا بمخبر تثمين الموارد الطبيعية قسم الكيمياء.

تختلف مصادر الانواع الاكسجينية النشطة وتعتبر السلاسل التنفسية الميتوكوندرية احدهم مصادر تشكل الجذر $O^{\circ-}_2$ الذي يولد من اضافة الكترون الى الجزئية الاكسجينية، ويحفز هذا التفاعل بفضـل السيتوكروم أوكسيداز الميتوكوندري :

$$O_2 + e^- \rightarrow O^{\circ-}_2$$

Cytochrom oxidase

ويمكن لهذا الجذر ايضا ان يتشكل عبر فعاليات البلعمة في وجود NADPH oxidase الغشائي.

$$2O_2 + NADPH \rightarrow 2O^{\circ-}_2 + NADP^+ + H^+$$

NADPH oxidase

كما يساهم النظام xanthine/ xanthine oxidase في تخليق الجذر الانيوني $O^{\circ-}_2$ إذ يحفز الأنزيم xanthine oxidase أكسدة الـ xanthine إلى حمض اليوريك في وجود الأكسجين

$$xanthine + O_2 + H_2O \rightarrow uric\ acid + 2O^{\circ-}_2 + 2H^+$$

xanthine oxidase

بينما يتشكل الجذر OH° انطلاقا من كسر الـ H_2O_2 في الحضور المعدني المختـزل، حيـث يـؤدي بيروكسيد الهيدروجين المرتبط بالحديدوز عبر تفاعل الـ Fenton إلى ما يلي:

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^\circ + OH^- + Fe^{3+}$$

ويمكن تفاعل البيروكسيد الهيدروجيني مع الجذر $O^{\circ-}_2$ أيضا من إنتاج OH° أو ما يعرف بتفاعل Haber- Weiss.

$$H_2O_2 + O^{\circ-}_2 \rightarrow O^\circ + OH^- + O_2$$

يعتبر الجذر الهيدوكسيلي (OH°) من اقدر الجذور على احداث عطب الجزيئات الضخمة بالرغم مـن اهميته في تامين العديد من الوظائف الحيوية كتفعيل متعادلات النوي، فهو المسـؤول عـن حـالات الطفور واحداث السمية (Raueng De Groot، 1998).

من اهم الاختبارات المعتمدة في تقييم الدور المانع للأكسدة هو اختبار$DPPH^\circ$ الذي بامكانه ان يستقبل الكترونا او جذرا هيدروجينيا ليصبح جزيئة مستقرة وفقا لما يلي:

DPPH

$$(DPPH°) + HO\text{-}R\text{-}OH \rightarrow (DPPH): H + HO\text{-}R\text{-}O°$$
$$HO\text{-}R\text{-}O° + (DPPH) \rightarrow (DPPH): H° + O = R= O$$

لقد أدلت دراسات عدة بان التداخل بين القدرة المانعة للتاكسد مع الجذرDPPH تتوقـف علـى عـدد جزيئات الـ DPPH التي يمكنها أن ترتبط بمجاميع الـ OH (Arjeun وآخرون،2003) حيث اقترحـا بأن DPPH يمكنه أن يقتنص الهيدروجين الفينولي للجزيئة المانحة للإلكترون. كما أن اختبارات الـ ـ deoxyribose التي تعتمد على توليد جذر الـ ـ OH° عبـر تفـاعلات الـ ـFenton حيـث يغـزو الـ ـdeoxyribose مكسرا إياه.

لقد عرفت الفلافونيدات بفعاليتها للحد من الغزو الجذري للطليعة $O^{°-}_2$ وذلك عبر آليـات الفعـل المانع للأكسدة إما عبر الأسر الجذري لكل من $O^{°-}_2$ أو$OH^°$ أو بتشكيل معقدات معها (Sanz وآخرون، 1994).

إن الاختبارات التي اجريت على المركبات الفلافونيدية المعزولة من *C. fuscatum* لتقييم معدلات الأسر الجذري لكل من DPPH° أو اختبار اللمعانية أو منع تحلل الـ ـ deoxyribose والتـي تعكـس وظيفة الاسر الجذري لكل من ROOH° و$O^{°-}_2$ و OH° على التوالي قد أدلت بـأن 8C2 ، 114 تكـاد تتصدر باقي المركبات تحت الدراسة لكونها تبدي استجابةآسرة للجذر $O^{°-}_2$ حيث تحقـق ذلـك عنـد التراكيز المنخفضة وبجرعة استجابية. إلاّ أن 8C3 قد حقق كفاءة معتبرة في أسر الجذر OH°

ويظهر أن المشتقات الليتيولينية ايضا قد إستجابت لأسر الـDPPH°.

تشير الدراسات السابقة التي تمحورت حول الفعل المانع للأكسدة لكل من (1996, Rice- Evans)، (2000, Pietta). بأن التداخل البنيوي الوظيفي وكذا الدور الرودوكسي المحدود يعزز كثيرا وظيفة الأسر الجذري إذ أن الاختزال الجذري يؤمنه المنح الهيدروجيني:

$$FL\text{-} OH + R° \rightarrow FL\text{-} O° + RH$$

حيث يمكن اعتبار الـR° أنيون البيروكسـيل أو $O^{°-}_2$ أو الـ ـ OH° كمـا يعتبـر FL-OH جـذر فلافونوكسي يتفاعل مع جذر آخر لاعطاء بنية كيينونيـة مسـتقرة (Hodnick وآخـرون، 1998) (شكل 10.B ،11.B).

شكل (10.B): البنية الكينونية المستقرة

شكل (11.B): أسر الجذور ROS (R°)

إن فحص بنى المركبات تحت الدراسة يوضح بأن المركبات 8C2 و8C3 وP114 و 11E أنهـا تتمتع بالروابط C_2- C_3 ووظيفة 4-oxo ويدعم هذا الرأي المقترح حول اهمية الحضور الحلقـي (C) غير المشبع والذي يتوقف عليه تيسير الحركية الالكترونية (Rice-Evans-، 2001). وتبـدي هيكلـة P114 بأنها تتمتع باثنين من مجاميع الهيدروكسيل بالموقع ortho ويوضح هذا مـدى اهميـة الهيكلـة ortho-diphenolic بالحلقة B.

وأكد Bors وآخرون (1987) هذا بأن الحلقة B تعتبر محددا رئيسيا للأسر الجذري حيث اعتبـر المجموع الكاتيكولي بالحلقة كمانح هيدروجيني، بل وتعتبر الجزيئات المالكـة لـ pyrogallol أكثـر نشاطا مقارنة بغيرها التي تملك مجموعة كاتيكول.

ويتفق هذا مع ماذهبت اليه Rice-Evans وآخرون (1996)، حيث أدلت بأن كل من الفلافونات مثل الـ apigenin التي تقتصر على مجموعة واحدة OH بالحلقة B أو كتلك التي تغيب بها تمامـا هذه المجاميع كما هو الحال بالـchrysin تبدي تقاربا في السلوك الأسر جذري وتقـل هـذه الوظيفـة

عندها مقارنة بالليتولين ذي (4'-OH, 3'- OH). وهذا أيضا أمكن الوصول إليه بدراستنا حيـث كانـت مشتقات 8C3 و8C2 أبلغ أثرا من مشتقات الـP7 وكذا الـkaempferol و11E. وتظهر أيضا نتائج هذه الدراسة بأن8C3 اكثر فعالية من 8C2 ويمكن أن يفسر ذلك من خلال المجموعـة OH بـالموقع 3، ولعل هذا يدعم الرأي الذي ذهب الى أن الموقع 3-OH مع الرابطة الثنائيةC_3- C_2 المجاورة للوظيفـة oxo -4 يعزز هذا الفعل. إلاّ أننا نجد بدراستنا هذه بأن المركب $8C_3$ استجاب بكفاءة عالية لاقتنـاص OH° ومخلبة الحديد ولعل هذا يعود إلى الإستبدال بالميتوكسـيل . فسـرVan Acker Sab وآخـرون (1996) بأن مانحات الإلكترون مثل $O- CH_3$ (alkyl) تختزل الجهد الرودوكسي للفينول رافعة بـذلك قوة المنع التأكسدي كما يرفع الجهد الرودوكسي للفينولات.

شكل (12.B): الفعل الرودوكسي للـquercetin

ويبدو أن الآراء متضاربة حول هذا الموضوع، حيث ادلـى Gabriele وآخـرون (2003) بـأن مجموعة الكاتيكول بالحلقة B لكل من الفلافون والفلافونول لا تبـدي اهميـة بالغـة لاجـل المـنح الهيدروجيني والاسر الجذري ويرجىء ذلك لكون الـ apigenin ذي المجموعـة (4'-OH)الوحيـدة بالحلقة B قد أبدت فعلا قويا يفوق حتى أثر الكرستين، بل ذهب الى أن الـ chrysin الذي يخلو كليـة من OH بالمواقعC-3' وC-4' لم تتعطل به هذه الوظيفة، كما أن جلكزة الموقع 7 بالفلافون لا تقلل من هذه الوظيفة كما هو الحال مع المركب 8C2 بدراستنا الحالية.

شكل (13.B): الفعل الآسر للجذور

كما أن الـ myricetin يلـتقط الـ ـ OH° أكفـأ مـن الـ ـ kaempferol وتلـتقط مشـتقات الـquercetin مثل rutin الـOH° حتى عند التراكيز المنخفضة (Manach وآخرون، 1997).وظهر هذا جليا بدراستنا عندما أعتمد الـrutin كشاهد مرجعي.

بالرغم من كون أيونات الحديد والنحاس لا تخلو مـن اهميـة فيزيولوجيـة كتشـكيل مركبـات الـhemoprotein ودخولها كعوامل مساعدة انزيميا مثل الـ dismutase و Catalase فإنها قد تتسـبب في توليد أخطر الجذور OH° من خلال هذا التفاعل

$$H_2O_2 + Fe^{2+} (Cu^{2+}) \rightarrow OH° + OH^- + Fe^{3+} (Cu^{2+})$$

إن مخلبة هذه المعادن يشكل إحدى أهم آليات الفعل المانع للأكسدة، وتدلي اختبارات المخلبة بهذه الدراسة بأن المركبات المفصولة من *C. fuscatum*:8C3, P7 قد تجاوبت مع الفعـل المخلبـي لأيـون الحديدوز بنسب متفاوتة، حيث تقارب فعل كل من8C3 وP7 إذ انطلق الأثر المخلبي (>% 50) بـدءا من التركيز µM 0.6، وأبدى المركب P7 فعلا ممخلبا قويا انطلاقا من التركيزµM 0,3، على حـين

تطلب المركب 11E تركيزا أكبرمن µM 10 لتحقيق مخلبة تفوق الـ 50%. أدلت الدراسـات بهـذا الشأن (Pietta، 1996) بأن الفلافونيدات يمكنها أن تسلك مسلكا ممخلبا عند الرابطة γ مع المعادن.

شكل (14.B):الفعل المخلبي للمعادن

وبذا فهي تتمكن من اختزال المقدرة الرودوكسية ليمكن اعتمادها آنئذ كموانع أكسدة ثانوية، وقـد يتم ذلك بتثبيت الصورة التأكسـدية للمعـدن (Jovanovic وآخـرون، 1997). كمـا أدلـى (Morel وآخرون، 1993) بأن مجاميع الكـاتيكول بالحلقـة B وكـذا مجمـوعتي3-OH و4-oxo بالحلقـة heterocyclic و5-OH ما بين الحلقة heterocyclic والحلقة A تشكل مجال مخلبة قوي يؤكد بشـكل ملحوظ الازاحة الباتوكرومية الناجمة عن مخلبة النحاس بواسطة الـ quercetin كما هو الحـال مـع مركبات الدراسة الحالية 8C3 وP7. ولقد أكدت ذلك دراسات Brown وآخرون (1998) مدلية بـأن التداخل بين أيون النحاس و3-OH فلافون يحدث ازاحة باتوكرومية بالحلقـة B بالمجـال المرئـي، وأدلى أن المركبات مثل الـ luteolin والـ rutin التي تضم بناها 3',4'-orthodihydroxy بالحلقـة B تبدي من خلال تداخلها مع ايون النحاس عصابة جديدة كميزة لحدوث المخلبة المعدنية ليرجع الطيف الفلافونيدي الأصل فور إضافة الـ EDTA. ويفسر Afanas وآخرون (1989) أيضـا أن الإمكانيـة المخلبية لـ kaempferol الذي يغيب به orthodihydroxy قد تعود الى المجموعة الكيتونية 4 بالحلقـة C، إضافة إلى التجاور الهيدروكسيلي. وأفادت هذه الدراسة التي ظهر منها طيفا مشوها بمجرد استبعاد النحاس بحدوث أكسدة جزئية عند كل من المجموعة '3 و'4. إن هذه الملاحظات قد تتفق مع ما ذهـب اليه (Morel وآخرون، 1993) بأن المجموعة 3-OH بالفلافونول يمكنها الجام تحول المركـب الـى الصورة المؤكسدة. إن اختزال القوة الرودوكسية بالفلافونيدات مع الجـذور: $O^{\circ -}_{2}$ ، peroxyl، aloxyl و OH° قد يعود إلى إمكانية تفاعل الـ aroxyl (FL-O°) مع $O^{\circ -}_{2}$ وفقا للتفاعل الآتي

$$FL\text{-}OH + R^{\circ} \rightarrow FL\text{-}O^{\circ} + RH$$:

مولدا الـ quinones بنية كينونية ثابتة حيث يمكن لجذر الـ aroxyl أن يتفاعـل مـع $O^{\circ -}_{2}$ مولـدا الـquinones و$O^{\circ -}_{2}$ ، وهذا التفاعل الأخير يمكنه أن يتم في مستويات عالية من الأيون المعدني وقـد

يكون مسؤولا عن الفعل المؤكسد غير المرغوب فيه للفلافونيد ليتحول الى pro-oxidant لترتفع بـه القدرة الرودوكسية التي يحكمها اضافة الى FL-OH /FL-O° المواقع التفاعليـة لجـذر الـ aroxyl (Bors وآخرون، 2000). ولعل هذا يفسر الى حد ما ماوصلنا إليه بهذه الدراسة حيث أمكن رصـد بأن 8C3 الفعال في مختلف الإختبارات قد تحدد أثره الآسرعند رفع معدلات التراكيز، بل تحول الـى طليعة مؤكسدة في وجود أيون الحديد بإختبارات المخلبة وذلك عند التراكيز التي تفوق μM 15. ولعل هذا ما يميز الفلافونول عن الفلافون (Awad وآخرون، 2002) . وفسر هذا ايضا بأن الـ quercetin يمكنه أن يسلك مسلك pro-oxidant بتشكيل جذر الـ quercetin من خلال التداخل مع سلاسل النقـل الإكتروني بالميتوكوندريا أو بفضل الأكسدة الذاتية مما يؤدي الى توليد $O^{\circ -}_{2}$. كمايساهم أيضا في توليد OH° من خلال اختزال Fe^{3+} إلى Fe^{2+} (Hodnick وآخرون، 1998).

Quercetin — semiquinone radical — O-quinone

شكل (15.B): أكسدة الـ quercetin

أثبت أن التداخل مع النحاس ينشط الطلائع المؤكسدة، ولعل هذا ما يفسر دور الفلافونيـدات فـي تثبيط العديد من الأنزيمات التي تتـدخل بالاسـتجابات الالتهابيـة NADH oxidase وprostaglandine والأثر المضاد للطفور(Metdiewa وآخرون، 1999). ولقد صنف الـ quercetin كـأقوى مضـادات الأكسدة ويتوقف هذا الاثر على التركيز، على حين ان الـ catechin ذو أثر طويل المدى مهما كـان التركيز (Manach وآخرون، 1997).

تغزو الأنواع الأكسجينية النشطة (ROS) الأحماض الدهنية غير المشبعة التي تشكل دعامة غشائية وتساهم الى حد بعيد في تأمين السيولة الغشائية. ومن أهم هذه الجـذور النشـطة جـذر البيروكسـيل (ROO°) الذي يتشكل عند اضافة الأكسجين الجزيئي على الجذور الحرة الكاربونيـة. وبـالرغم مـن نشاطها المحدود فهي تتمكن من الانتشار بيسرعبر الأغشية البيولوجية وبإمكانها ان تتحلل الى جـذور البروكسيل وجذور الـ aloxyles (RO°) وهذه الأخيرة تكون أكثر نشـاطا (Mullr ، 1998)، تقفـز سلسلة من التفاعلات لاحداث الأكسدة الفوقية للبيدات عن طريق كسر هذه اللبيدات

الهيدروبيروكسيدية الى جذر البروكسيل والألوكسيل والتي بدورها تلتقط الهيدروجين وتحدث سلسـلة تفاعلات الأكسدة اللبيدية مما ينعكس بـاختلالات وظيفيـة وبنيويـة (Cao وآخـرون، 1997). إن استحداث الأكسدة فوق اللبيدية *in vitro* بالميكروزومات الكبدية بأنظمـة مختلفـة وتعريضـها الـى جرعات مختلفة من المركبات الفلافونيدية مكّن الى حد ما من الإيحاء بالتخصص الوظيفي لكل مركب تجاوبا مع الصيغة حيث يمكن أن تتدخل الفلافونيدات بنقل الأيون المعدني بشكل منفرد، وقـد يرافـق ذلك اختزال لبعض العوامل المؤكسدة مثل الأسكوربات، او عن طريق أسـر اللبيـدات الألوكسـيلية والجذور البروكسيلية عبر المنح الهيدروجيني (Saija وآخرون، 1995)، أو بتدعيم توليد الفيتـامين E باختزال الجذر α-tocopherol أو عبر مخلبة الأيونات المعدنية. وقد يعود هذا الى الطبيعة الليبوفيليـة لبعض المركبات التي تمكن من تغلغلها بين الاغشية (Ratty وآخرون، 1988). إن نتـائج الدراسـة الحالية أبدت بأن النظام Fe^{2+}/ascorbate المولد للأكسدة اللبيدية الميكروزمية عبر تفاعلات الـ Fenton استدعى تدخل المركبات الفلافونيدية kaempferol وP7 على حين اسـتجابت المركبـات الفلافونيديـة isoquercitrin و8D1 للنظام CCl_4/NADPH المولد عبر النظام السيتوكرومي CYP450 الجذر $CCl_3°$ والذي بدوره يكون مسؤولا عن سلسلة التفاعلات المؤكسدة للبيدات الغشائية (Mullr ، 1998).

لقد ذكر سابقا بأن المجموعة الكاتيكولية بالحلقة B وكذا الرابطة الثنائية (C-3 وC-2) المقترنة مع الوظيفة oxo وكذا مجاميع الهيدروكسيل بـ C-3 وC-5. يعتبر المجال التثبيطي الأمثل للأكسدة اللبيدية (Coa وآخرون، 1997؛ Terao وآخرون، 1994). وسجل بشكل بأن الفلافونولات تبـدو أنجـع فـي تحقيق هذا الفعل بفعل المنح الهيدروجيني مقارنة بالفلافونات (Manach وآخرون، 1997). ويبدو أن هذه النتائج تتجه بنفس مسار دراستنا حيث أنّ كل مـن8D1 وisoquercitring وهـي فلافونـولات قـد أستجابت لهذا الفعل بصورة ابلغ مقارنة بالفلافونات (11F ، 8C1 ، E43). إن المركبات القطبية مثـل الـrutin يقل بها الفعل التثبيطي للأكسدة عبر كسر سلاسل التفاعل ويتوقف هذا على التركيز، حيث ينخفض بتزايد التركيز(Laughton وآخرون، 1991).

$$LOO° + AH \rightarrow LOOH + A°$$
$$LO° + AH \rightarrow LOH + A°$$

فعند التراكيز العالية من المواد المانعة للتاكسد فإن معدل التفاعل يكون محدود بمحدودية:

LOO° وLO° وبالتالي تصبح المعادلة : $A° + O_2 \rightarrow AOO°$ أكثر أهمية، وينتج مستوى منخفضا من الجذور من طرف الجزيئات اللبيدية:

$$AOO° + LH \rightarrow LOOH + L°$$
$$A° + L\text{-}H \rightarrow LOOH + L°$$

إن استبدال مجاميع الحلقة الفينولية بالمجاميع الألكيلية يرفع من الكثافـة الإلكترونيـة ويحفـز نشـاط الإستقبال الإلكتروني. كما أن حضور مجموعة هيدروكسيلية ثانية بالحلقة العطرية يحقق الفعل المـانع للأكسدة وهذا في حالة استبدال المركبات بالموقع C-1 ،C-2 أوC-1 ،C-4، بينما اعتبرت مجاميعC-1

C-3، هيدروكسيل أقل فعالية (Rice-Evans وآخرون، 1996). ذكر Van وآخرون، (1996) بأن كلا من الـ apigenin وdiasming والـ flavanoles تبقى محدودة الأثر حيث قدر الـ IC_{50} بـ 3000 µM على حين قدر هذا الفعل بـ µM 7.3 بالنسبة لـ catechin مقاربا بـذلك فعلكـل مـن quercetin وluteoling بالنسبة لتثبيط نظام Fe^{2+}/Ascorbate وكـذا الـ CCL_4/NADPH (De Groot و Rauwen، 1998).

وهذا يفسر ما وصلنا اليه في تجاربنا حيث أمكن رصد بأن الفافونولات (isoquercetrin و8D1) تتحول إلى طلائع مؤكسدة باختبارات تواجد الأيونات المعدنية وتحقق ذلك بالتراكيز العالية. وقد أشـير بـأن الـ quercetin قد سلك مسـلك مؤكسـدا(pro-oxidant) فـي الحضـور المفـرط للحديـد (نظـام Fe^{2+}/ascorbate), وأمكن الاقتراح بأن جذر الـ quercetin أمكنه توليد جذر الـ $O^{°-}_2$ مـن خـلال التداخل مع سلاسل النقل الإلكتروني بالميتوكوندريا وعن طريق الأكسدة الذاتيـة بـل وتمكـن الـ quercetin من اختزال Fe^{3+} إلى Fe^{2+} مما يعني توليد الجـذر النشـط OH° (Hodnick، وآخـرون، 1998). ولعل هذه الآلية هي التي تفسر الأثر التثبيطي لبعض الفلافونيدات للعديد من الأنزيمات التـي تتدخل بالاستجابات المضادة للالتهاب مثل انزيمات الـ Prostaglandin والـ NADH oxidase والدور المضاد للطفور (Bolton وآخرون، 2000).

الخلاصـة:

إن تنوع مصادر الجذور الأوكسيجينية ROS المخلة بهيموستازيا الرودوكس يقتضي تنوع آليـات الفعل الواقي. اهتمت هذه الدراسة [إختبار الفعل المانع للأكسدة لثلاث مستخلصات بيتانولية لكـل مـن *C. fuscatum* ، *H. cheirifolia* ، *C. vulgaris* *in vivo* و*in vitro* بغية إنتقاء أكثر هذه المستخلصـات نجاعة، وإخضاعها لدراسات التحليل الكيميائي، ثم إختبار الفعل المانع للأكسدة لبعض من المركبـات الفلافونيدية.

أسفرت نتائج هذه الدراسة عن أن المستخلص البيتانولي لكل مـن *C. fuscatum* و *H. cheirifolia* قد أبدى فعلا واقيا تمثل في تراجع مؤشرات السمية المستحدثة *in vivo* بالـCCl_4 عنـد 200 mg/Kg وعند 200-400 mg/Kg على التوالي. واستبعدت *C. vulgaris* لعدم كفاءتها في تحقيق ذلك.

أدلت الإختبارات: أختزال اللمعانية، أسرDPPH° ، أسر$O_2^{°-}$ ، deoxyribose ، الدور المخلبي التي أجريت على المركبات الفلافونيدية المعزولة من *C. fuscatum* أن :

- 8C2 كل من و 114 استجابا لأسر $O_2^{°-}$ (1-2 µM) و(2-5 µM) التوالي بينما استجاب 8C3 عند (4-5 µM).
- أبدى هذان المركبان فعلا آسرا لـDPPH° كآلية للمنح الهيدروجيني عند (5-10 µM) مقارنـة بالـisoquercitrin (1-10 µM).

- أسـتجاب الفلافونـول 8D1 للنظـام CCl_4/NADPH عنـد (2.5-10 µg/ml) مقارنـة بالـisoquercitrin واستجاب الفلافون E43 لنفس النظام متطلبا تركيز اكبر. بينمـا اسـتجاب الأيزوفلافونول 113 على النظام Fe^{2+}/ascorbate مقارنة بالـkaempferol (0.5-10 µg/ml).
- أبدى 8C3 فعلا آسرا للـ OH° عند 10 µM ، وإرتفاع التركيزإلى 25 µM يحوله الى طليعة مؤكسدة.
- أظهر P7 دورا ممخلبا معتبرا للحديد (0.3-10 µM) بينما تطلب 11E 10 µM لتحقيق الدور المخلبي واستجاب الفلافونول المستبدل 8C3 بدءا من التركيز 0.6 µM.

2. الأثر الوقائي للمستخلص البيتانولي *C. fuscatum* من السمية المستحدثة *in vivo* بمضادات السلINH وRMP و أيضيات الـ INH

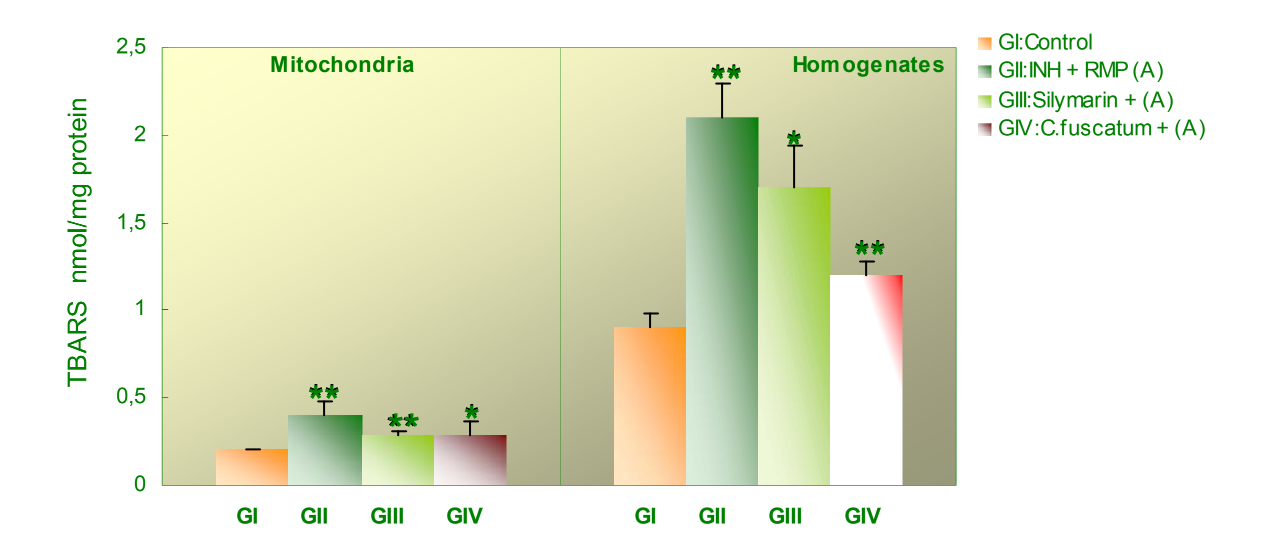
.

أثرالمستخلص البيتانولي لـ *C. fuscatum* على الجهد الرودوكسي*in vivo*

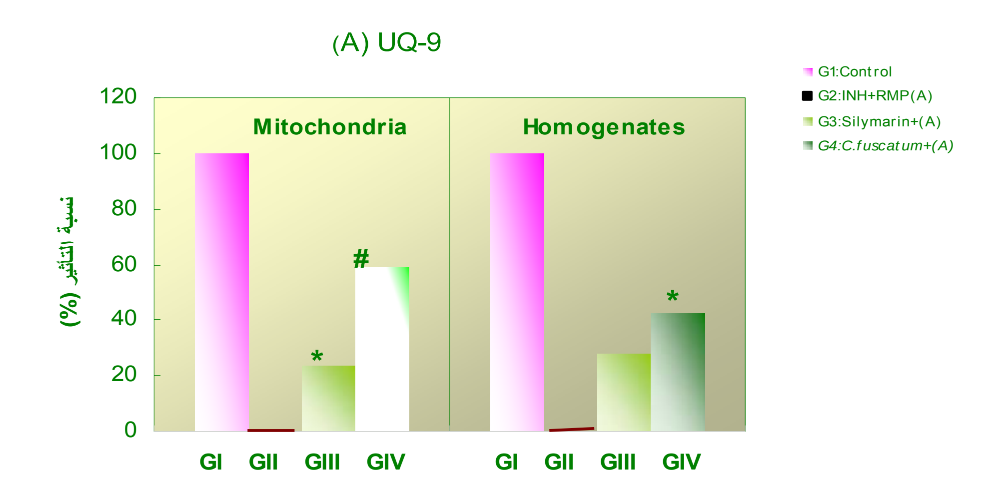
1.2 أثر المستخلص البيتانولي لـ *C. fuscatum* على الجهد الرودوكسي بالجرذان المعاملة بـ INH وRMP *in vivo*

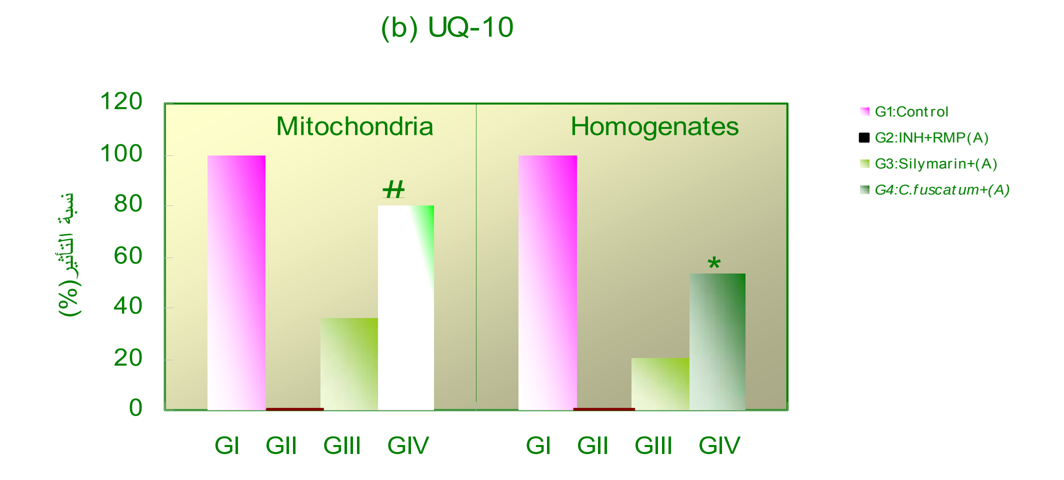
جدول (4.B) : أثر المستخلص البيتانولي لـ *C. fuscatum* على العلى الإجهاد التأكسدي المحرض بالـ isoniazid (INH) وrifampicin (RMP) بكل من المجنس الكبدي والميتوكوندريا.

GIV	GIII	المجموعة
C. fuscatum + (A)	Silymarin + (A)	المعاملة
		Homogenates
[f]15	[f] **63	CAT [a]
16	**25	CuZn SOD[b]
#78	#53	GSH[c]
**80	*58	GSH-px [d]
*42	28	UQ-9 [e]
*53	20	UQ-10[e]
		Mitochondria
*40	#79	CAT [a]
*41	*40	MnSOD [b]
#80	#68	GSH [c]
**62	16	GSH-px [d]
#58	*23	UQ-9 [e]
#80	36	UQ-10 [e]



شكل (15.B) : الأثر الوقائي للمستخلص البيتانولي *C. fuscatum* على الأكسدة اللبيدية بكل من المجنس الكبدي والميتوكوندريا لدى الجرذان المعاملة بالـ isoniazid وrifampicin.
n = 6; ** P<0.01, *p<0.05





شكل (16.B) : الأثر الوقائي للمستخلص البيتانولي *C. fuscatum* على كل من UQ-9 (a) و UQ-10 (b) بالمجنس الكبدي و الميتوكوندريا بالجرذان المعتملة بال isoniazid وrifampicin .

الأثر الوقائي (%) = قيم (RMP + INH) – قيم العينة / قيم (RMP + INH) – قيم الشاهد x 100

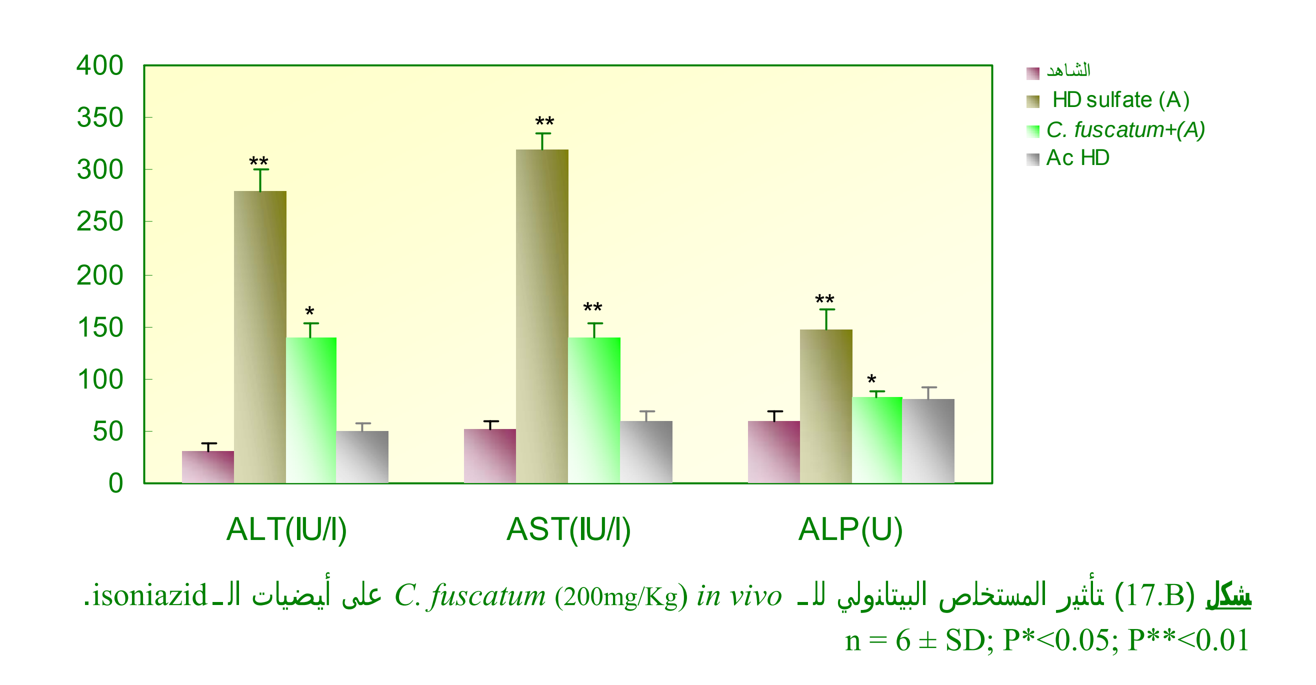
n = 6; #P<0.001, ** P<0.01, *p<0.05

تدلي نتائج الدراسات الخاصة برصد الفعل المانع للأكسدة *in vivo* للمستخلص البيتانولي مقارنـة مع silymarin ذي الدور الوقائي المعروف سابقا، بأن الجـرذان المعاملـة بكـل مـن INH وRMP (50 mg/Kg لمدة 15 يوما) تولد بها TBRAS بشكل معنوي، ويظهر الشكل (15.B) بأن أثر الأكسـدة الليبيدية يكون جليا بالمجنس الكبدي.

إن المعاملة المسبقة لكل من المستخلص البيتانولي لـ *C. fuscatum* أو silymarin تمنح دورا وقائيا معتبرا يترجمه تراجع هذه الأكسدة الليبيدية والذي يتجلى أكثر بالميتوكوندريا الشـكل (15.B). تـدلي

نتائج الجدول (4.B) بأن مضادات السل INH وRMP تحدث خللا كبديا يعكسه اضـطراب واخـتلال كافة أنظمة الدفاع المانعة للأكسدة تحت الدراسة (SOD, GPX, GSH, CAT), إن المعاملـة المسـبقة للمستخلص البيتانولي والـsilymarin تعيد هذه الأنظمة إلى نشاطها الطبيعي إلى حد كبيـر، ويبـدوأن الـsilymarin ترفع بشكل معنوي نشاط الـ catalase بما يكـافئ (% 79-63) بكـل مـن المجـنس والميتوكوندريا على حد سواء. ويظهر الجدول (4.B) أن مستويات الجلوتاتيون قد تحسنت بكـل مـن المجنس الكبدي وكذا الميتوكوندريا لدى الجرذان المعاملة مسبقا بكل مـن *C. fuscatum* وsilymarin، يظهر أن هذه الاستجابة كانت أبلغ بكبد الجرذان المعاملة بـ *C. fuscatum* (% 80-78). كما أن الـ ـ GPx استجاب بدوره بشكل معتبر لمعاملة *C. fuscatum* (% 80-62). يظهر أن نشاط الـ ـ Mn SOD احتفظ به بشكل مماثل بكبد الجرذان المعاملة بـ *C. fuscatum* وكذا بـ silymarin على حـين تنفـرد الـsilymarin بالاحتفاظ بـ CuZn SOD (% 70) كما يلخص ذلك في الجدول (3.B). ولعل أهـم مـا يلفت النظر بنتائج هذه الدراسة هو مدى إمكانية صيانة ubiquinol (UQ-9) و(UQ-10) إذ قـدر ذلـك بـ (% 80-42) كما هو مدون بالجدول (4.B)، ويكون هذا الأثر أبلغ (% 80) بالمحتوى الميتوكوندريي من UQ-10 [شكل (16.B) a،b].

2.2 أثر المستخلص البيتانولي لـ *C. fuscatum* علىالجهد الرودوكسي المحرّض بأيضيات الـ INH بالجرذان *in vivo*

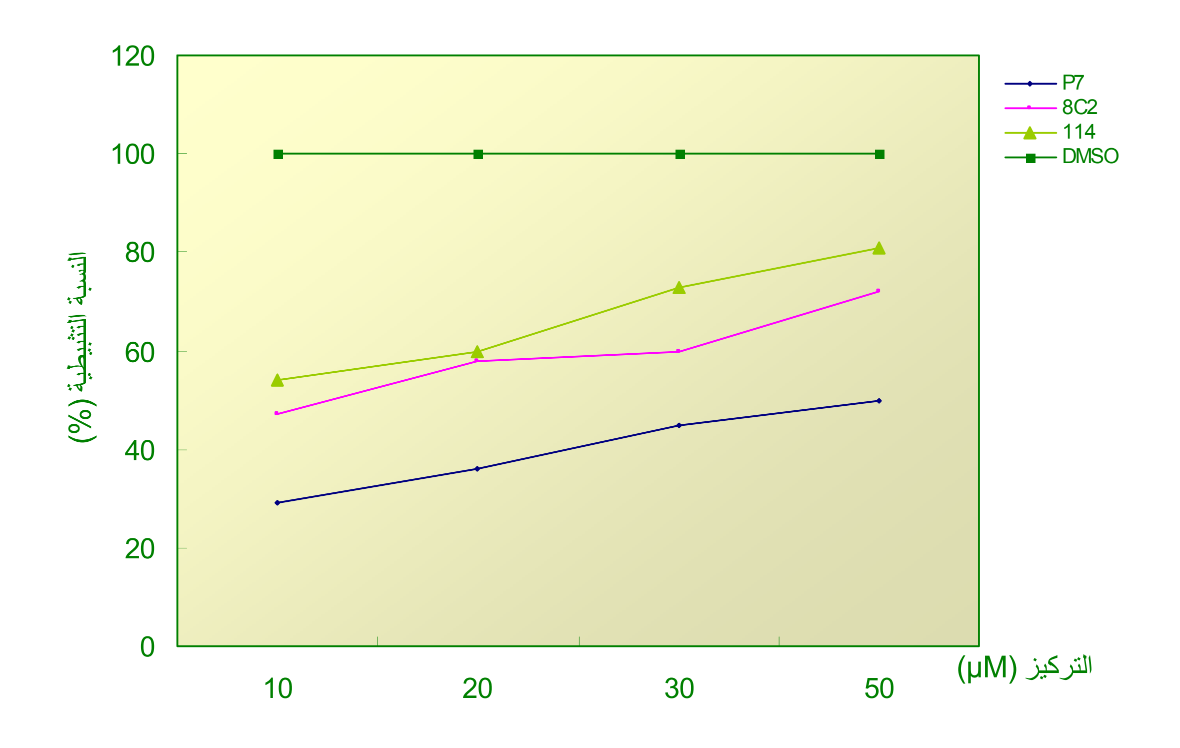


شكل (17.B) تأثير المستخلص البيتانولي لـ *in vivo* (200mg/Kg) *C. fuscatum* على أيضيات الـisoniazid.
n = 6 ± SD; P*<0.05; P**<0.01

إن الجرذان التي عوملت بجرعة منفردة (300 mg/Kg) من كل من HD sulfate وAc HD أبدت إستجابة معتبرة للـ HD sulfate في شكل سمية كبدية يترجمها ارتفاع النشاط المصلي لناقلات الأمـين (AST، ALT) وكذا ارتفاع معدل نشاط ALP مقارنة بالشواهد ؛ بينما لم يبد المركب الأيضي Ac HD أثرا يذكر(شكل 17.B). ويظهرمن ذات الشكل أن المستخاص البيتانولي لـ *C. fuscatum* قد عدل مـن معدل التسرب الأنزيمي (ALT، AST، ALP) بما يكافيء 56، 67، 74 % على التوالي.

3 تأثير المركبات الفلافونيدية المعزولة من *C. fuscatum in vitro* على العزلات الكبدية المعاملة بالـ hydrazine

1.3 تسرب الـ LDH



(b)

شكل (19.B): أثر المركبات الفلافونيدية المعزولة من *C. fuscatum* على نشاط الـ LDH: µM x 10^{-1} (purivate/min) (19.B، a) من بالعزلات الكبدية المعاملة بالـ hydrazine. النسبة التثبيطية (19.B، b).

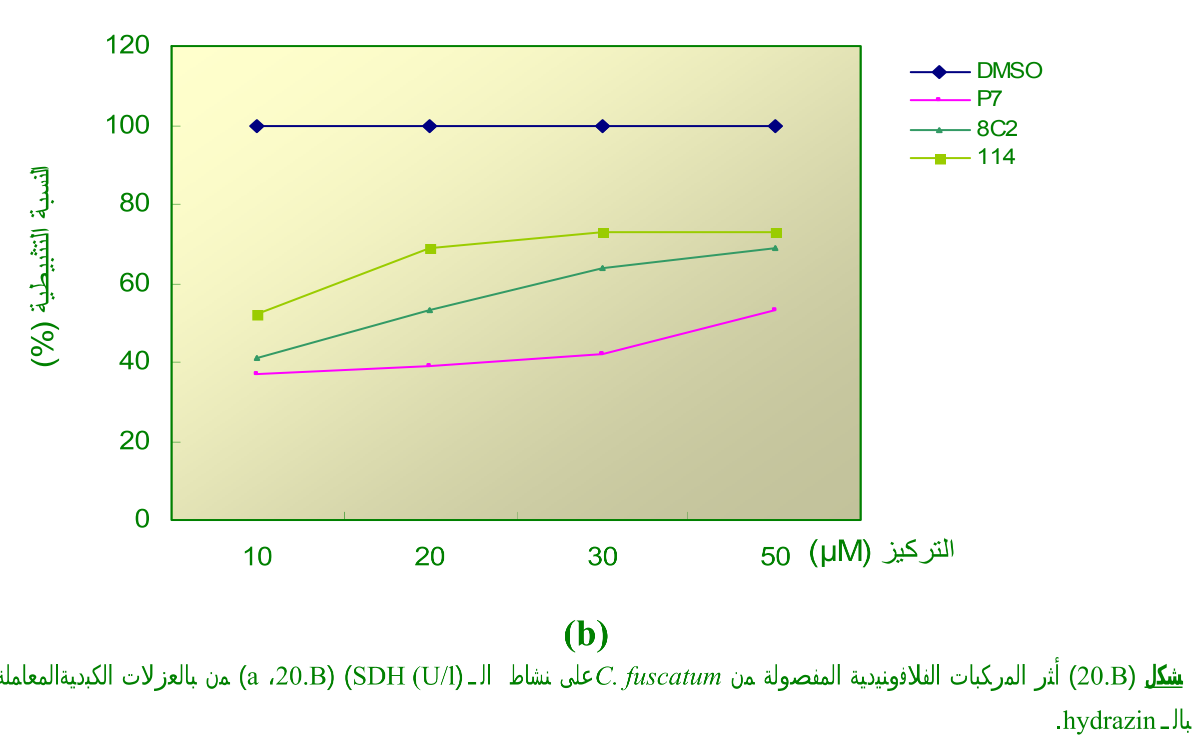
n = 3 ± SD; P*<0.05; P**<0.01; $P^{\#}$<0.001

النسبة التثبيطية: $A_S / A_{HD} - A_C \times 100$

حيث: A_{HD} : قيم HD؛ A_S : قيم العينة؛ A_C : قيم الشاهد

إن اختبار حالة الـ cytotoxicity التي يترجمها مدى تسرب الـ Lactate dehydrogenase كمؤشر للعطب الغشائي بالـ Hypatocyte يلخصها الشكل (19.B، a) والتي أظهرت بأن الهيدرازين قد رفع من معدل هذا التسرب من (3.4-12.3 µm x 10^{-1}). ولقد انحصر الفعل الواقي للمركب P7 للحد من تسرب الـ LDH ما بين (29-45 %) بالمجال التركيزي(10-50 µM)، بينما حد المركب 8C2 معدل هذا التسرب بما يكافئ (58%) عند التركيز 20 µM وتدرج زيادة بزيادة التركيز، على حين تفرد المركب P114 بإحداث استجابة ملموسة (54%) بدءا من التركيز 10 µM وبلغت(73%) عند التركيز 30 µM (شكل 19.B، b).

2.3 نشاط الـ SDH



(b)

شكل (20.B) أثر المركبات الفلافونيدية المفصولة من *C. fuscatum* على نشاط الـ(SDH (U/l) (20.B، a) من بالعزلات الكبدية المعاملة بالـhydrazin.

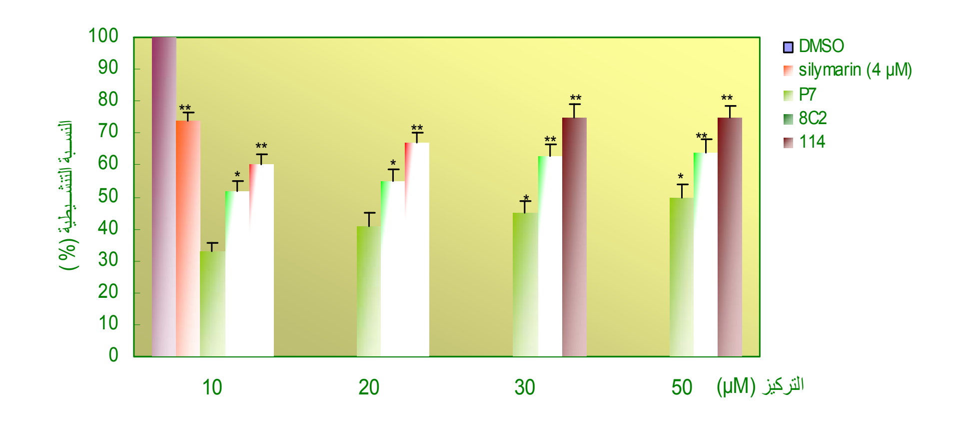
النسبة التثبيطية (20.B، b) ؛ $n = 3 \pm SD; P^{*}<0.05; P^{**}<0.01; P^{\#}<0.001$

$A_{HD} - A_S / A_{HD} - A_C \times 100$ حيث

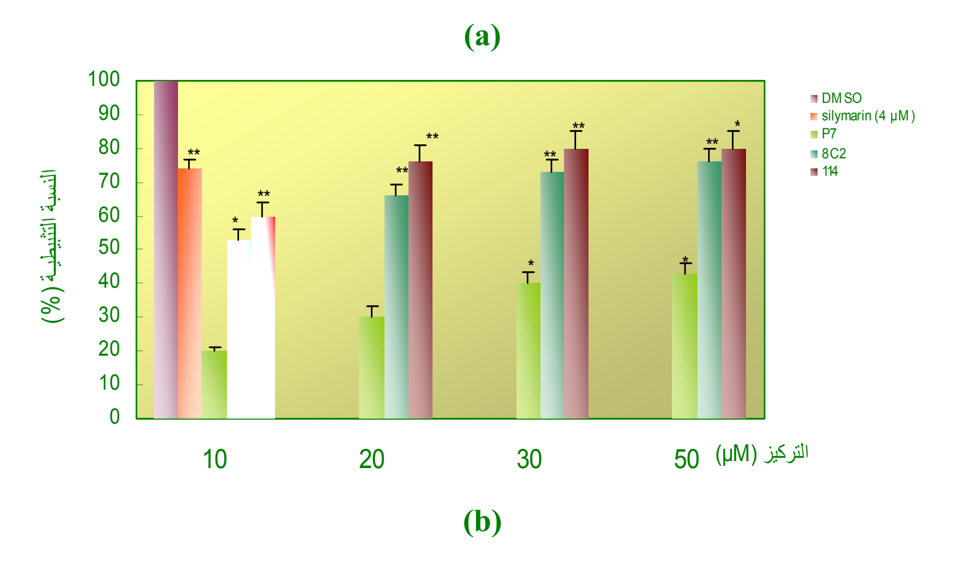
A_{HD} : قيم HD، A_S : قيم العينة، A_C : قيم الشاهد

أدت معاملة العزلات الكبدية بـ100 µM من الهيدرازين لمدة 10 ساعات إلى رفع معدل تسـرب الـ SDH من(0,51 U/l) إلى(29,3 U/l)كمؤشر على العطب الميتوكوندري بهذه العـزلات الكبديـة (20.B، a)، ويبدو أن المركب P7 لم يعدل من هذا العطب بشكل ملموس إذا لم يزد تأثيره عن (37-42 %) عندما انحصر تركيز هذا المركب ما بين (10-50 µM) وتطلب 50 µM لإحـداث تـأثير قـدره (53 %)؛ بينما أبدى المركب 8C2 فعلا واقيا لتسرب الـ SDH بفعل الـ HD تزايد بتزايـد التركيـز بدءا من التركيز 20 µM إلى غاية 50 µM قدر بـ(53- 69)، وأظهر المركب P114 أثرا أبلـغ حيـث أبدى استجابة (61 %) انطلاقا من التركيز 10 µM (20.B،b).

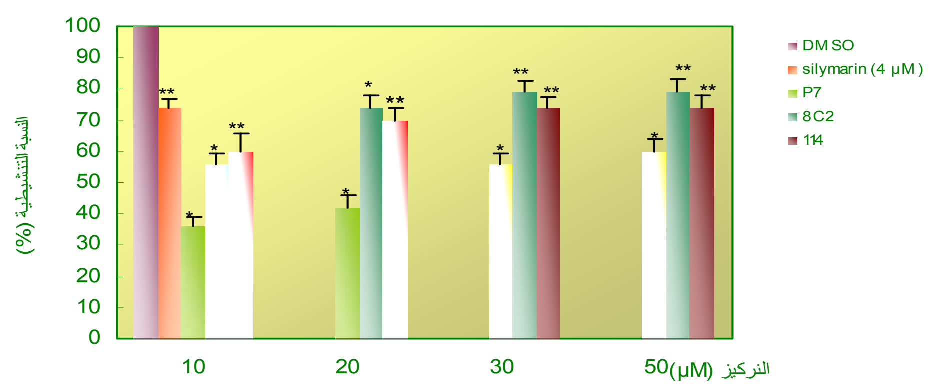
3.3 أثرالمركبات الفلافونيدية المعزولة من *C. fuscatum* *in vitro* على النظام الجلوتاتيوني بالعزلات الكبدية المعاملة بـHD



(a)



(b)



(c)

شكل (21.B):   أثر المركبات الفلافونيدية المعزولة من *C. fuscatum* على النظلم الجلوتاتيوني بالعزلات الكبدية المعاملة *in vitro* بالـhydrazin. GSH (21.B،a)؛ GST (21.B،b)؛ GR (21.B،c).

النسبة التثبيطية: A_{HD} - A_S/ A_{HD} - A_C x 100

حيث: A_{HD}: قيم HD؛ A_S: قيم العينة؛ A_C : قيم الشاهد

n = 3 ± SD; P*<0.05; P**<0.01; $P^{\#}$<0.001

تدلي نتائج هذه الدراسة والملخصة بالجدول(5.B) بأن كلا من الـGSH والـGR والـGST قد اختلت محتوى ونشاطا عندما عرضت العزلات الكبدية إلى 100 µM من الـ HD، حيث انخفضت مـن 17 µM إلى 10,2 µM لكل mg protein ومن 3,34 U/ mg protein إلى 1,20 U/mg protein ومـن 0,36 µM إلى 0.06 µM لكل mg protein على التوالي. ويبدو أن المركبين $8C_2$ و P114 يتقاربان في حفظ هذا النظام من الاستنفاذ حيث احتفظ بمحتوى الـ GSH بما يكافئ (52- 60%) بداء من التركيـز 10 µM (21.B، a)، ويظهر من الشكل (21.B،b) بأن المركب P114 تدخل بقوة في حفظ نشاط الـ GST حيث سجل (60- 76%) عندما انحصر التركيز ما بين (10-20 µM). وتقارب أثر كل من 114 و8C2 على نشاط الـGR عند التركيز (20-50µM) حيث حققا فعلا واقيا انحصر ما بين (74- 79%) مقارنة بالـsilymarin (14.B، c).

المناقشة

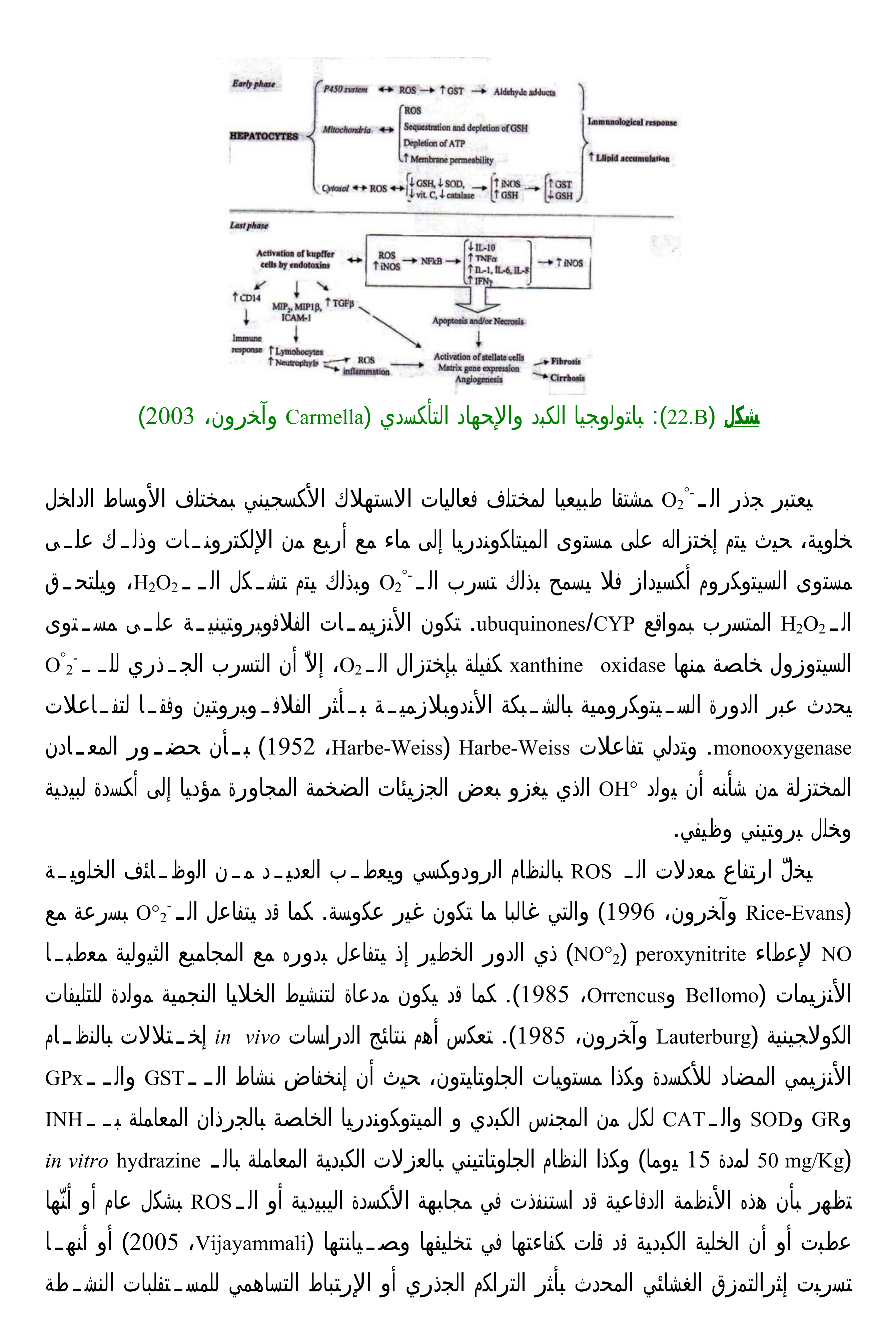
لا يزال الـisoniazid أحد أهم مضادات السل المتداولة منذ تاريخ 1952 حتى الساعة بـالجزائر كغيرها من دول العالم (Francis وآخرون،2006) لما له مـن فعاليـات معتبـرة فـي صـد آثـار *Mycobacterium*، (Sarich وآخرون، 1999)؛ إلاّ أن هذا النشاط العلاجي بل وحتى الوقائي يزود به الأفراد الذين هم عرضة لهذا المرض مهنيا أو الذين تعرضوا لداء السيدا (Stuart وGrayson، 1999) حماية لهم من المضاعفات المتوقعة، ويكون غالبا مصحوبا بإختلالات عصبية خطيرة وسـمية كبديـة تميزها أعراض الالتهاب الكبدي من الغثيـان والقـيء و الاصـفرار والإسـوداد البـولي (Francis وآخرون،2006).

لقد أدلت الدراسات بأن حوالي 207 ‰ من الأشخاص يعانون من الالتهاب الكبدي الحاد، 46% منهم يموتون(Houston وFanning، 1994)؛ ويتجلى هذا بصورة أوضح لدى النساء. ويرفع التعـاطي الدوائي معدلات ناقلات الأمين بالشهر السادس (Angelo وآخرون، 2005)، ولعل ذلك يحـدث مـن جراء تحول الـINH إلى مستقلب نشط سام (Skakun وShmank'O، 1985) حيث يؤسـتل أولا إلـى acetyl hydrazine وهذا الأخير يمكن أن يؤستل ثانية إلـىdiacetyl hydrazin غيـر السـام (Jenner وTimbrell، 1994) أو يخضع إلى تحولات عبر السيتوكروم CYP450 إلى جذر الـ acetyl° السـام الذي قد يثبت تساهميا على البروتينات (Hyman، 1991). تخضع هذه الأستلة إلـى تنظـيم وراثـي وتكون بطيئة لدى 40% من السلالات البيضاء و السوداء إلاّ أن 90 % من اليبانيين يتميزون بأسـتلة سريعة (Hussain وFrazier، 1996). ولعلّ هذه السلوكيات المتباينة هـي التـي تعكـس التفسـيرات المتباينة لطرق إحداث السمية التي ترتبط عادة بالتنميط الوراثي (Lauterburg وآخرون،1985). فبعد أكثر من 30 سنة من الجزم في السمية المحدثة بـINH فإن الميكانزمات التـي تفسـر ذلـك لا زال يعتريها الغموض، إذ ذهب البعض (Yue وآخرون، 2004) إلى أن INH يؤسـتل ثـم يحلمـه إلـى

isocotonic وacetyl hydrazine. وذهب هذا الفريق من الباحثين إلـى أن الأشـخاص ذوي الأسـتلة السريعة يكونون أكثر عرضة للسمية(Pessayre، 1977)، بينما لم تعر دراسات أخرى هذا المفهوم أي اهتمام إذ لم تحدد علاقة وثيقة بين الأستلة والسمية (Mitchell وآخـرون، 1975؛ Francis، 2006) على حين أكدت دراسات أخرى أن النمطية البطيئة الأستلة تكون أكثر عرضة للسمية، وتبريرهم لذلك أن الميتابوليزم البطيء ينجم بـإختلاف مسـارات ميتـابوليزم الـ INH عبـر مسـارات تناوبيـة بالسيتوكروم CYP450. وعزز هذا المفهوم عند تعاطي متزامن للأدوية المحرضة لهذه السيتوكرومات مثل الـ rifampicin (Prerce، 1992). وضبط أن هنـاك ارتبـاط وثيـق بـين تركيـز الأنيلـين هيدروكسيلاز المؤشر عن النمطية السيتوكرومية CYP2E1 والهيدرازين مما يوحي بحدوث تحـريض معتبر للـ CYP2E1 (Mookan وآخرون،2000).

لقد وجد فعلا أن التعاطي المتزامن للـ RMP يرفع مكافئ السمية 5-8% لتظهرالإلتهاب الكبـدي بالأسبوع الأول من التعاطي الدوائي (Park، 2005). وأكّد Dehuznavadz (1983) بأن تناول INH مرفقا بـ strptomycin وPAS يرفع معدلات CYP450 ويعكس هذا التزامن بتثبيط الإفراز الصـفراوي ورفع معدلات LPO وCYP450 (Victoria وآخرون، 2004). كما أن تحريض CYP2E1 بدوره يكون مدعاة لتحرير الجذور الحرة ROS ومنها الـ $O_2^{°-}$ و$OH°$ وH_2O_2. وتكون أكبر مصادر الـ H_2O_2 فـي وجود NADPH المسؤول عن LPO ويحدث خاصة بالشبكة الأندوبلازمية مجـال تموقـع CYP2E1 (Jenner وآخرون، 1995).

إن هذه الجذور الحرة النشطة أو المستقلبات النشطة من شأنهاأن تملك خاصية الارتباط التساهمي مع الجزيئات الضخمة محدثة أكسدة ليبيدية، استنفاذ مخـازن الجلوتـاثيون، وعطـب ميتوكونـدري (Guntupalli وآخرون، 2006). أن الجدلية القائمة بأن مسـتقلبات الـ INH مـن الـ hydrazine والـ acetyl hydrazine حول الدور السمي لكل منهما دفعت بنا إلى إختبارهما كجرعة منفردة *in vivo* (300 mg/Kg). وقد رجحت نتائج هذه الدراسة بأن الـ hydrazine يبدي سمية كبدية معتبـرة مقارنـة بالـ acetyl hydrazine يعكسها ارتفاع معدلات ناقلات الأمين الأنزيمية وكذا ارتفـاع معـدل نشـاط الفوسفاتاز القاعدي. ويتفق هذا مع ما ذهب إليه Victoria وآخرون (2004). ولعل هـذا يعـود إلـى الارتباط التساهمي للهيدرازين مع الجزيئات الضخمة الليبيدية أو للاجها التأكسدي الناجم عـن تـراكم منتجات CYP2E1 (ROS)؛ فأهم مظاهر الإختلالات الهيموستازية أكسدة مجاميع الثيـول (Marcella وآخرون، 2006) بسيستيئين GSH مولدا GSSG أو أريلة بروتينية (عبر الأحماض الأمينيـة)، وقـد يتعدى هذا إلى الارتباط بالشق البروتيني لـ CYP2E1 وكذا النسيج غير البرانشـيمي محفـزا خلايـا Kuppfer المولّدة للسيتوكينات والوسائط النتروجينية (Morally وآخرون، 2006).



شكل (22.B): باتولوجيا الكبد والإجهاد التأكسدي (Carmella وآخرون، 2003)

يعتبر جذر الـ $O_2^{°-}$ مشتقا طبيعيا لمختلف فعاليات الاستهلاك الأكسجيني بمختلف الأوساط الداخل خلوية، حيث يتم إختزاله على مستوى الميتاكوندريا إلى ماء مع أربع من الإلكترونات وذلك على مستوى السيتوكروم أكسيداز فلا يسمح بذلك تسرب الـ $O_2^{°-}$ وبذلك يتم تشكل الـ H_2O_2، ويلتحق الـ H_2O_2 المتسرب بمواقع ubuquinones/CYP. تكون الأنزيمات الفلافوبروتينية على مستوى السيتوزول خاصة منها xanthine oxidase كفيلة بإختزال الـ O_2، إلاّ أن التسرب الجذري لـ الـ $O^{°}_2{}^{-}$ يحدث عبر الدورة السيتوكرومية بالشبكة الأندوبلازمية بأثر الفلافوبروتين وفقا لتفاعلات monooxygenase. وتدلي تفاعلات Harbe-Weiss (Harbe-Weiss، 1952) بأن حضور المعادن المختزلة من شأنه أن يولد $OH^{°}$ الذي يغزو بعض الجزيئات الضخمة المجاورة مؤديا إلى أكسدة لبيدية وخلل بروتيني وظيفي.

يخلّ ارتفاع معدلات الـ ROS بالنظام الرودوكسي ويعطب العديد من الوظائف الخلوية (Rice-Evans وآخرون، 1996) والتي غالبا ما تكون غير عكوسة. كما قد يتفاعل الـ $O°_2{}^{-}$ بسرعة مع NO لإعطاء peroxynitrite ($NO°_2$) ذي الدور الخطير إذ يتفاعل بدوره مع المجاميع الثيولية معطبا الأنزيمات (Bellomo وOrrencus، 1985). كما قد يكون مدعاة لتنشيط الخلايا النجمية مولدة للتليفات الكولاجينية (Lauterburg وآخرون، 1985). تعكس أهم نتائج الدراسات *in vivo* إختلالات بالنظام الأنزيمي المضاد للأكسدة وكذا مستويات الجلوتايتون، حيث أن إنخفاض نشاط الـ GST والـ GPx وGR وSOD والـ CAT لكل من المجنس الكبدي و الميتوكوندريا الخاصة بالجرذان المعاملة بـ INH (50 mg/Kg لمدة 15 يوما) وكذا النظام الجلوتاتيوني بالعزلات الكبدية المعاملة بالـ hydrazine *in vitro* تظهر بأن هذه الأنظمة الدفاعية قد استنفذت في مجابهة الأكسدة الليبيدية أو الـ ROS بشكل عام أو أنّها عطبت أو أن الخلية الكبدية قد قلت كفاءتها في تخليقها وصيانتها (Vijayammali، 2005) أو أنها تسربت إثرالتمزق الغشائي المحدث بأثر التراكم الجذري أو الإرتباط التساهمي للمستقلبات النشطة

(Halliwell، 1996)، إذ وجد بأنّه عادة ما يصاحب تراكم ROS أو النشـاط التسـاهمي للمسـتقلبات إختلالات جزيئية، تتمثل في التثبت التساهمي للجزيئة الإلكتروفيلية على مختلف المواقع النكليوفيليـة للبروتين أو للحمض الأمني. وبالرغم من أن هذا الإرتباط لا يكون نوعيا إلاّ أنّه يبدي درجات متفاوتة من التأثير حيث قد تحدث إرتباطات رخوة مع مجاميع SH السيستئين أو الميثيـونين ومجـاميع NH_2 بالليزين والأرجنين؛ أما الإرتباط الصاب فقد يصاحب المواقع النكليوفيلية الصلبة كما هو الحـال مـع الأحماض النووية التي ينجم عنها سرطنة وطفور (Keith وآخرون، 2006).

إن أهم المظاهر الجزيئية للإختلالات الإستقلابية هي الأكسدة الليبدية، فإستقرار جذر مـا علـى كاربون ليبيدي أو إنتزاع لذرة هيدروجين تحت أثر هذا الجذر يشكل جذرا لبيديا يثبت الأكسجين فورا معطيا LPOO° الذي يتفاعل بدوره مع جزيئة لاحقة معطيا هيدروبيروكسيد وجذر ليبيدي جديد ليقفـز هذا التفاعل عبر السلاسل الليبيدية لتؤكسد الليبيدات غير المشبعة وتجزأ إلى وحدات أصغر (alcanes، malondialdehyde، alcenals) (Terao وMarri، 1999). تنشط هذه الأخيرة وترتبط بدورها تساهميا مع البروتينات، ويظهر هذا جليا بدراساتنا *in vivo* اثناء المعاملة بالـ INH و *in vitro*بالـ hydrazine حيث ارتفعت بها معدلات MDA وصاحبها التسرب الأنزيمي والعطب البروتيني الذي يعكسه ارتفـاع ناقلات الأمين وإنخفاض نشاط النظام المانع للأكسدة. إن تفاعل الـ H_2O_2 وأحـد معـادن الأنزيمـات (SOD أوCAT) قد يولّد الـ OH° أوAlko° الذي يغزو بدوره حمضا أمينيا مجاورا وذلك بإنتزاع جذر H° من الكاربون C_α لباقي حمض أميني أو الخاص بـ C_3 لباقي الليزين، لمجموعة ثيول السيستئين أو للحلقة العطرية التيروزينية. فالجذرOH° الناجم عن تفاعلات Fenton قد يقطـع السلاسـل الببتيديـة ويشكّل مجاميع الكاربونيل، إذ أن إنتزاع الـ H° بتدخل الـ OH° في حالة الحمـض الأمينـي يصـنع الجذر C° الذي يتفاعل مع الأكسيجين الجزيئي $O_2^{°-}$. تنعكس حوادث الأريلـة البروتينيـة بـإختلالات هيموستازية إذ تكون 10% من البروتينات السيتوزولية وكذا بروتينات العضيات خاصة الميتوكوندرية والشبكة الأندروبلازمية عرضة لهذه الطوارئ، إذ تلخـص الفعاليـات علـى مسـتوى البروتينـات عبرgluthiolation, وprotein thiol oxidation وarylation (Chuan وآخرون، 2006). تظهـر نتـائج هذه الدراسة خاصة منها *in vivo* بأن بعض البروتينـات الميكروزوميـة (GST) الخاصـة بـالطور الإستقلابي الثاني كانت عرضة للتغير. إن إستنفاذ الجلوتاتيون يمكن أن يعكس عواقب عدة: فهو يعيق إقتران المستقلبات الإلكتروفيلية والتي تثبت كليا مع البروتين الكبدي بدلا مـن طرحـه. كمـا يعـزز الإستنفاذ الجلوتاتيوني الأكسدة الليبيديـة. وتـنعكس أكسـدة الجلوتـاتيون بأكسـدة مجـاميع الثيـول بالبروتينات(Curpeet وأخرون، 2006).

إن CAT بدوره يعتبر أحد الأنزيمات الهيمية والذي يوجد غالبا بـ peroxisomes والتـي تهـدم H_2O_2 المولّد إثر تدخل أنزيمات الأكسدة علـى مسـتوى العضـيات خاصـة منهـا الميتوكونـدريا (Gutteridge وHalliwell، 1985). إن منع التفاعل الجذري مع معـادن هـذه الأنزيمـات أو أسـر

جذور$O°_2^-$ قد يمنع إستنفاذ هذه الأنزيمات، وقد ظهر هذا بشكل إستجابة ملحوظة سواء على مستوى الميكروزومات أو الميتوكوندريا بالدراسات *in vivo*.

إن التحسن الملحوظ الذي لمس إثر التعاطي المسبق للمستخلص البيتانولي 200 mg/Kg بالدراسات *in vivo* والذي تجلى خاصة بالنظام الرودوكسي GSH، GPx، UQ الميكروزومي والميتوكوندري على حد سواء وكذا النظام الجلوتاتيوني بالدراسات *in vitro* إذ سمح بصيانة النظام الرودوكسي (GSH-px، GSH، GST، GR). ينتشر الـGSH-px بوفرة بكل من الكبد والكريات الحمراء ويتموقع بكل من السيتوزول والميتوكوندريا، وهو بروتين فلافوني يتمتع بالـFAD كمنبع للقدرة الإختزالية. وفضلا عن دوره الإختزالي للبيروكسيدات والهيدروبيروكسيدات في وجود GSH فهو يساهم في حفظ الجلوتاتيون من الأكسدة، كما يساهم على مستوى الصفائح و اللمفاويات في إختزال hydroperoxide ، prostaglandine. كما يعتبرالجلوتاتيون (GSH) مادة تفاعل للـGSH-px مؤمنا بذلك الفعاليات السابقة في استبعاد البروكسيدات بتحويله إلى الجلوتاتيون المؤكسد (GSSG) والذي يرجع فورا في وجود GR اعتمادا على NADPH المولّد عبر المسارات البنتوزية. المعدلات التي يعجز GR عن إختزالها (في حالة إنخفاضه أو إستنفاذه) تستدعي تصدير (GSSG) خارج الخلايا وتكون مؤشرا على حالة إجهاد تأكسدي تتحسسه الخلية بشكل معتبر(Freya وCarry، 2001)، إذ أن التراكيز المعتبرة من GSSG توقف تنشيط NF-KB المسؤول عن إحداث إستجابة لبعض التنبيهات، على حين تثبط التراكيز المرتفعة من GSSG الإرتباط التنشيطي للـNF-KB بمواقعه على DNA (Deleve وkaplowitz، 1991). فضلا عن ذلك فإن الـGSH يتمتع بخواص فيزيولوجية ومناعية شتى أهمها الدور الرودوكسي المعتبر إذ يعتبر ملتقطا جذريا لكل من $OH°$ و$NO°_2$، $RO°$، $RO°_2$، $O°_2^-$، كما أن تفاعله الجذري يولد جذر $GS°$ ويساهم هذا الأخير في إزالة سمية H_2O_2 وتخليق leukotrein. وقد اعتبر أكثر من 90% من المركبات الكبريتية اللابروتينية بالخلية عبارة عن GSH (0.1-10 mM) (Griffith ، 1999). ويقوم أيضا بصيانة المجاميع الكبريتية بالبروتينات وإزالة المواد الغريبة وإفرازها، ونقل الأحماض الأمينية (جاما-جلوتامين). وينصب أغاب الاهتمام على أهم مجموعة يحتويها سيستيئين هذا الجلوتاتيون وهي SH–، وهو مرافق أنزيمي للـglyoxalase ومزيل لمجاميع الميثيل بالأكسدة ومعدل لإشارات التنظيم الرودوكسي ومخزن وناقل للسيستيئين مخلق لـ deoxyribonucluotide، ومنظم للـ leukotrein وprostaglandine (Ann De وLiska، 2001). أماالـGST فهو أهم الأنزيمات الميكروزومية بالطور الإستقلابي الثاني إذ يساهم في إزالة السمية عن طريق تأمين إقتران المستقلبات الإلكترفيلية بالـGSH استعدادا لطرحها عبر الصفراء يختلّ دوره هذا من جراء إستنفاذ الـ GSH خلال السمية. إن التحسن الطارئ للنظام الرودوكسي بتدخل المستخلص البيتانولي لـ *C. fuscatum* والمركبات الفلافونيدية يتم بصيانة مستويات الـGSH الذي يشكل مادة تفاعل للـGR وGSH-Px (Wills وAsha، 2006).

تملك الخلية آليات عدة للحد ذاتيا من تدخل المستقلبات المتشكلة حيث قد تسـكن فـورا الجيـب الهيدروفوبي بالسيتوكروم CYP450 مما يفقدها نشاطها وبالتالي الحد من السمية المتوقعة كما يمكنها أن تتثبت تساهميا مع أبوبروتين CYP على آزوت الهيم أو بتشكيل معقد غير نشط إثر الإرتبـاط بالحديـد الهيمي، كما يساهم epoxide hydrolase الميكروزومي أو السيتوزولي أو النووي في تحويل العديد من الـ epoxides إلى dihydrodioles غير السامة (Porpen وآخرون، 2006) إذ أن اقتران الغالبية مـن الإكترفيلات بالجلوتايتون يفقدها هذه السمية ويحكم هذا التفاعل التلقائي أنماط GST. كمـا ان تعزيـز النظام السيتوكرومي الميتوكوندري لسلاسل التفاعل الإلكتروني المحفزة للاختزال التكافؤي الربـاعي للأكسيجين يمنع تسرب قدر معتبر من الوسائط النشطة تشكل أساليب دفاع ذاتية بالخلية الكبدية. ولـذا فإن تعزيز مثل هذه الأنظمة يعتبر ميكانزما وقائيا أو علاجيا.

تبـدي الدراسـة الحاليـة خاصـة منهـا دراسـات الـ *in vivo* أن المسـتخلص البيتـانولي لـ *C. fuscatum* قد عزز كثيرا من خط الدفاع الأولى: SOD وCAT بالميتوكوندرياحيث رفع معدلات نشاطها مقارنة بتلك الخاصة بالجردان التي تعاطت الدواء بمفرده أي أنه حفظها من الاستنفاذ. ونعلـم جيدا أن كلا من الـ SOD والـCAT تنشط الإلتقاط الجذري داخل خلويا، إذ تتركز داخليـا بـوفرة مقارنة بالخارج خلوي، ولعل ذلك بسبب الحضور المعدني المفـرط،(Fe^{++}, Cu^{++}) والـذي يقتضـي التدخل الإقتناصي الفوري قبيل التأزم وتوليد الجذر OH° الخطر(Christina وآخرون، 2006). ولعـلّ المستخلص البيتانولي لـ *C. fuscatum* الغني بالفلافونيدات الجليكوزيدية قـد لعبـت دورالممخلبـات المعدنية حيث منعت التفاعل الجذري مع معادن هذه الإنزيمات. إن نجاح المستخلص البيتـانولي فـي صيانة هذا النظام الرودوكسي يعني مدى أهمية المحتوى الغزير من الفلافونيدات وهـذا مـا أكدتـه تجارب الدراسات *in vitro* بالعزلات الكبدية المعاملة بالـ Hydrazine حيث أبدت أن 114 و 8C2 قـد ساهما في تحقيق ذلك.

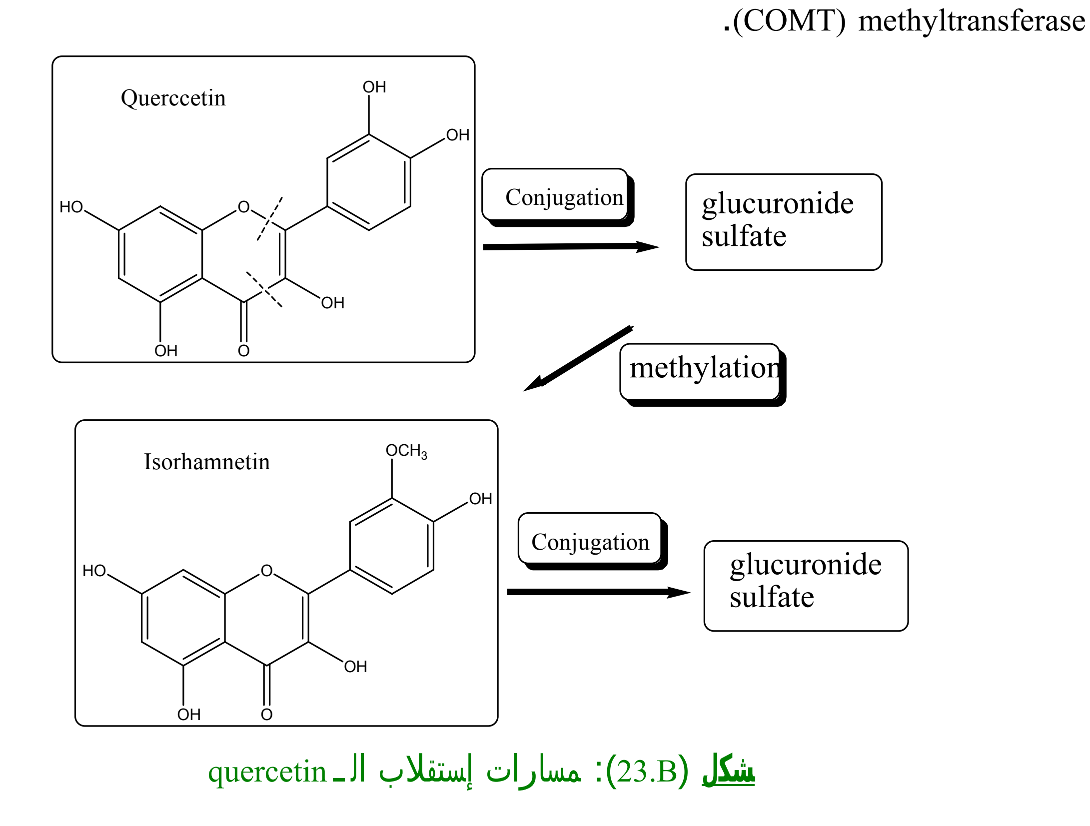
إن الفلافونيدات يمكنها أن تخضع إلى إستقلاب خلوي *in vivo* عبرثلاث ميكانزمات ، كأن تقترن بمجاميع الثيول خاصة منها الـGSH (شكل 23) أو تخضع للاستقلاب التأكسدي، أو للإستقلابات الخاصة بالنظام السيتوكرومي (Rice-Evans وآخرون، 1996).

إن أهم الفعاليات التي تبديها الفلافونيدات بيولوجيا كالدور المانع للأكسدة إثـر فعاليـات الأسـر الجذري أو من خلال التأثير على المواقع الرودوكسية الداخل خلوية كما أسلفنا لازال يعتريها الكثيـر من الغموض (Evren وآخرون،2006) ويكون التعقيد أبلغ بالنسبة للفعاليات *in vivo*. لقد بات جليا أن الوحدات الفعالة للفلافونيدات المستقلبة *in vivo* تكون مغايرة لما كانت عليه البنية الأصلية، إذ تتحـول الأجليكونات وبعض الجليكوزيدات إلى مقترنات ومستقلبات عبر الأنبوب الهضـمي (Gee وآخـرون، 2000). وبالرغم من أن الغموض لازال يعتري سلوكيات الفلافونيدات *in vivo* فإن بعض الإقتراحات تدلي بأن مدى ذوبانيتها بالمستحلبات الصـفراوية يمنحهـا إمكانيـة الامتصـاص المعـوي (Graefa

وآخرون، 2001) ، كما أشير إلى أن الفلافونيدات الجليكوزيدية تمتص بعسر على مسـتوى المعـي الدقيق لكونها ذات هيدروفيلية عالية تحد من ذوبانيتها بالمسـتحلب. تـتمكن β-glucosidase الفلـورا المجهرية من حلمهتها بالمعي الغليظ (Midle وآخرون، 2004) وتعتبر كلا مـن Enterobacterie و Bacteroides distasanrs المسؤولة عن هذا النوع من الانزيمات (Bokkenher وآخـرون، 1987). إن الفلافونيدات الممتصة عبر الطلائية المعوية ترتبط في مسيرتها بالألبومين لتحمل إلى الكبد عبر اللمف أو الوريد البابي (Hollman، 1995)؛ وتتعرض آنئذ إلى تحولات استقلابية كعمليات ميثلة للمجـاميع الهيدروكسيلية، واختزال لمجاميع الكاربونيل وكذا إلى الإقتران مع حمض الجلوكورونيك أو حمـض الكبرتيك (شكل 6)، إذ تكمن Manach (1995) من الكشف عن glucorone وsulfoconjugates ببلازما الجرذان المغذاة بكل من الـ quercetin والـrutin .

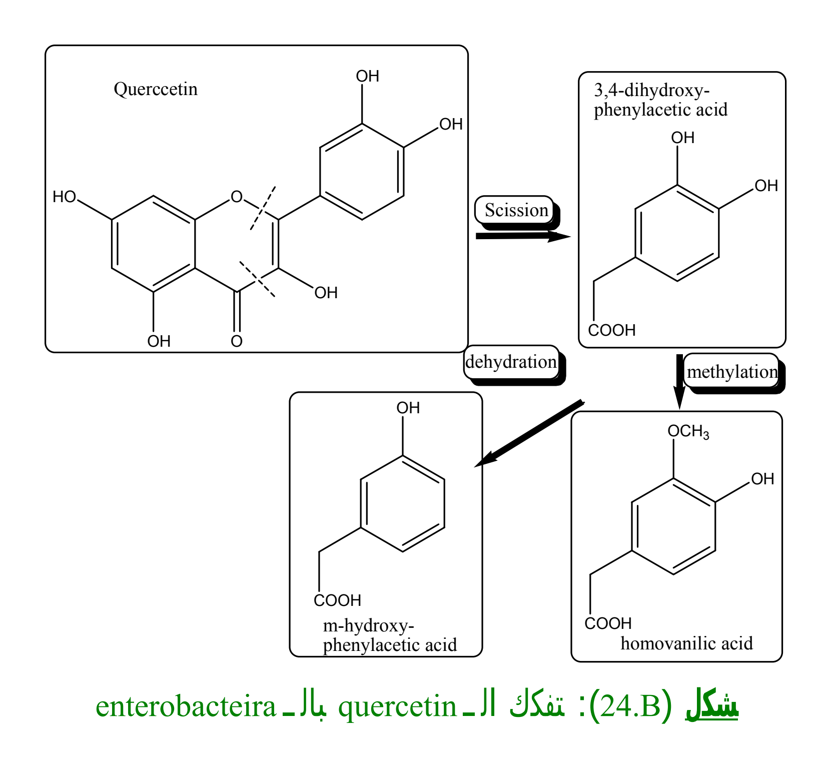
شكل (23.B): إستقلاب الفلافونيدات *in vivo* (Robert و آخرون، 2004)

وأمكن الإدلاء بأنّه تم الكشـف عـن مقترنـات الـ quercetin : isorhametin (3-*O*-methylated quercetin) مرتبطة بالألبومين عندما زودت الجرذان بـ 0.25 % مـن الفلافونيـدات 20 % منهـا quercetin. ولقد تم الكشف عن هذه المقترنات خلال 24 ساعة بكـل مـن البولـة والصـفراء (Shu وآخرون، 2006)، وتساهم كل من الكلية والأمعاء إلى جانب الكبد في تأمين اسـتقلاب الفلافونيـدات وذلك بفضلالانزيمات:LIDP-glucoranyl-transferase الخاص بـالإقتران وكـذا انزيمـات الميثلـة: *O*-methyltransferase والهدرسكلة (CYP450) (Sadesivan وآخرون، 2006) كمـاأن قسـما مـن الفلافونيدات غير المهضومة تكون عرضة لـ glucuronidation بالمخاطية المعويـة. وأشـار (Zhu وآخرون، 1994) بأن كاتيكول بنية الكرستين يتعـرض لـ *O*-methylation بتـدخل catechol-*O*-methyltransferase (COMT).



شكل (23.B): مسارات إستقلاب الـ quercetin

إن الفلافونيدات التي تتحول إلى مقترنات ومستقلبات عبر الإمتصاص المعـوي، تخضـع إلـى diglycosylation بالطور الأول واستقلاب بالطورالثـاني للاجليكونـات الناتجـة كالـ quercetin و hispiduling و luteolin متحولة إلى glucuronides و sulfates عبر الأمعاء (Otake وآخرون،2001) ومن جديد عبر الكبد بشكل (Galati وآخرون، 2001) ليعقب ذلك تحولات عدة على مستوى القولـون (Chen وآخرون، 1997) إذ يتم هدمها إلـى أحمـاض فينوليـة (Silvine و Balz، 2006) تمـتص وتستقلب لاحقا عبر الكبد.



شكل (24.B): تفكك الـ quercetin بالـ enterobacteira

لقد أشار Hollman وآخرون (1995) بأن الفلافونيدات التي تماثل المركبات تحت الدراسة التي تخضع للإمتصاص المعوي عبر الناقل الصودي الجليكوزيـدي ($SGLT_1$) (Walle وWalle، 2003) شكل 2 إنطلاقا من مرحلة الحلمهة بـالإنزيم النـوعي β-glucosidase ($β_5$، $β_6$) (Ferry وآخـرون، 1996). ويتدخل phloridzin hydrolase lactate (LDH) بالزغابة المعوية لإتمام ذلك بالنسبة للثديات وهذا ما تم تأكيده بالنسبة لـ luteolin, quercetin, diosmetin (Shimoi وآخرون، 1998؛ Walggren وآخرون، 2000).

ويبدو أن الطّريقة التي تدخل بها الجرعة ذات أثر بالغ في تحديد تأثيراته إذ أشارت دراسات تمت بادخال (g 4) من الـquercetin عبر الفم وg 100 عبر الوريد بأن الجرعة الوريدية تكون ذات نصف عمر بلازمي (24 سا) ويكون حجم التوزيع منخفضا Kg/L 0.34 ، ولم يسجل تغيير ملحـوظ سـواء بالبولة أو بالبلازما ليطرد عبر البراز% 53 من الـquercetin (Gee وآخرون، 2000). ومن الملفـت للنظر تماثل قرائن كل من الـ quercetin والـ rutin كما إلا أنها تختلف توزيعا (Evlund وآخـرون، 2000). وتدلي دراسات النظائر الموسومة (^{14}C) للـquercetin الأجليكوني بأن التناول الفمـوي ذو كفاءة امتصاصية عالية تقدر بـ (36-54%) ويطول نصف العمر الاشعاعي البلازمي بما يزيـد عـن 20-72 ساعة (Ferry وآخرون، 1996)، وقد يكون مرد هذا إلى الدوران البوابي الكبدي وكذا مـدى تواجد المستقبلات الكرستينية ذات الدور البيولوجي المعتبر(Moon وآخرون، 2000). وأشار(Walfran وآخرون، 2002) إلى أن المسار الافرازي في صـورة carbon dioxide يكـافئ (% 81-23) مـن الجرعة ولعل هذا ذو علاقة بالتدخل البكتيري بالقسم النهائي من الأمعاء شكل(24.B)

وقد وجد أيضا أن النواقل الغشائية تتحكم بالقدرة الامتصاصية والنشاط الحيـوي وأشـهر هـذه النواقل الغشائية هي ($SGLT_1$) وكذا monocarboxylate الذي حدد حـديثا (Moon وآخـرون، 2000) والذي يختص بـ ECG الشاي. كما حدد MRP_2 كناقل أنيوني للفلافونيدات الجليكوزيديـة (Donovan وWilliamsang، 2003). لازالت الآراء متضاربة حول الفعل المانع للأكسـدة للفلافونيـدات *in vivo* ، فبينما ذهب البعض إلى أن الاقتران البلازمي للـ quercetin يختزل كفاءته المانعة للتأكسد بأن تكـون أقل كفاءة التقاطية للجذور مقارنة مع أصولها الأجليكونية (Myyake وآخرون، 2000) فـإن Teraro وآخرون (1990) قد أدلوا بأن التعاطي لجرعة (10-50 mg) م للـ epicatechin يظهر بمعـدل 42 % بعد 6 ساعات بالبلازما، ليكون 70 % منها غير مميثلة ويميثل 30 % الباقية، ولا يقترن أقل من 7 % منها، وظهرت حوالي 84 % من المستقلبات بالبلازما وأكدوا أن هذه المستقلبات أثبتت اختياريا كفاءة معتبرة في الأسر الجذري كما مارست الدور المخلبي للمعادن (Jelmer وآخرون، 2006). وعلى ذلك وتماشيا مع معطيات Bor (2000) التي تدلي بأن *O*-dydroxyl ترفع من الفعل المـانع للأكسـدة فـإن المجاميع المستقلبة والتي تحتفظ بمجاميعها الكاتيكولية يناط بها هذا الدور (Housteen، 2000). وذكر (Gurpeet، 2006) بأن إبطال الفعل المانع اللأكسدة لبعض المستقلبات قد يكون مرده إلى حـدوث O- methylation على الموقع 5 بالحلقة B (Afanase وآخرون، 1989).

لا يقل أثر الفلافونيدات الجليكوزيدية حيث أن ارتباطها القطبي ذو أهمية بالغة ولا يختلـف دور الفلافونيدات الجليكوزيدات المجاميع الهيدروكسيلية بالموقعين '3 و'4 عن أجليكوناتها بل وذهب البعض إلى أن طبيعة المستقلب في حد ذاتها تختلف أثرا إذ أدات تجربة حضنت بهـا الميكروزومـات مـع الـ quercetin، أن الـ quercetin-3-glucuronide أكثـر منعـا للأكسـدة مقارنـة ب-quercetin-4-glucuronide. وأكد Moridani وآخرون (2003) أن الفلافونيدات الجليكوزيدية أبـدت فعاليـة أكبـر باختبار DPPH مقارنة بغيرها.

الخـلاصة:

أبدت دراسة الفعل الوقائي بالمستخلص البيتانولي مـن سـمية مضـادات السـل INH و RMP (50mg/Kg) لمدة أسبوعين بأن المعاملة المسبقة بـ mg/Kg 200 للمستخلص البيتانولي قد تسببت فـي تراجع الـ LPO وتحريض النظام المضاد للأكسدة . اعتبرت صيانة النظام الرودوكسي الجلوتـاتيوني (GSH، GSH-px) والنظام الإيبيكينولي UQ-9 وUQ-10 بكل من المجنس الكبدي والميتوكوندريا مـن أهم آليات هذا الدور الوقائي.

أدلت الدراسات *in vivo* التي استحدثت بهـا السـمية بأيضـيات الـ INH بجرعـة منفـردة (300 mg/Kg) من الـHD قد حققت فعلا سميا معتبرا إثر تسـرب الـ ALT والـ AST مقارنـة بالـAcHD.

أمنت المركبات 8C2 و114 صيانة الأغشية البلازمية للعزلات الكبدية المعاملة بـ100 μM من HD إثر منع تسرب كل من الـ LDH و الـSDH ؛ كما حرضت هذه المركبات النظام الرودوكسـي الجلوتاتيوني (GSH، GR، GST) . حقق المركب114 فعلا وقائيا أبلغ عند (10-30 μM).

إن صيانة أغشية الـhepatocyte و الميتوكوندريا التي عكسها منع تسرب كـل مـن الـ LDH والـSDH دفع بنا إلى إختبار فعالية المركب 8C2 على الوظـائف الميتوكوندريـة *in vitro* بالبـاب اللاحق.

4 أثر المركبات الفلافونيدية على الجهد الرودوكسي بالميتوكوندريا

1.4 أثر المركبات الفلافونيدية على الوظائف الميتوكوندرية

جدول (6.B) أثر المركبات الفلافونويدية على الاستهلاك الاكسجيني (nM/mg/min) بالميتوكوندريا بأدنى و أقصى تركيز (10^{-4} M ، 10^{-9} M)

التركيز	10^{-9} M		10^{-4} M	
	الطور 3	**الطور 4**	**الطور 3**	**الطور 4**
Apigenin	19±110	9±29	#15±63	5±19
8C2	20±119	8±28	22±123	9±28
kaempferol	22±124	8±29	#12±74	*8±30
الشاهد	12 ±117	6±21	12 ±117	6±21

المتوسط ± S.D. ، (n= 3)

#P<0.001, ** P<0.01; * P<0.05.

1.1.4 أثر الفلافونيدات على التنفس الميتوكوندري



(a)

(b)

شكل (25.B) : الجرعة الإستجابية للفلافونيدات (luteolin، apigenin، kaempferol) على النسبة التنفسية RCR (25.B، a): V4/V3 ، P/O (25.B، b): ADP/O_2 (O_2 المستهلك بالطور3)

يتضح من نتائج هذه الدراسة أن المركبات الفلافونيدية luteolin، apigenin، kaempferol ترفـع من مقدار الاستهلاكية لـ O_2 (الطور 3) كما تبدي دور تثبيطيا للطور4 عند التركيـز الأعلـى (0,1 mM) محدثة بذلك اختزال علـى مسـتوى السلاسـل التنفسـية ($RCR = V_4/V_3$) وكـذا الـ ـ P/O (شكل25.B)، (جدول6.B). ولم تبد الفلافونيدات أثرا معتبرا على الـ RCR والـ ـ P/O عنـد المجـال التركيزي M 10^{-6} و10^{-9}. تبين هذه النتائج بوضوح أن المركبات الفلافونيدية تحـت الإختبـار عنـد استهلاكها بإفراط قد تنعكس بآثار سلبية.يرتبط أثر المركبات الفلافونيدية على السلاسل التنفسية بفعالية الجرعة الاستجابية القصوى حيث يظهر بالمنحى الثنائي الأطوار الذي يصاحبه تزايد بطيء في معدل P/O عند التركيز المنخفض M 10^{-7} إلى 10^{-9} وتناقص في النسبة P/O عند التراكيـز العاليـة (10^{-4} M). إن هذه المركبات الفلافونيدية تؤثر على الأطوار 3 و 4 كما هو مدون بالجدول (6.B).

2.1.4 أثر المركبات الفلافونيدية على الجهد الغشائي

جدول (7.B) الأثر التثبيطي للفلافونيدات على الجهد الغشائي بالميتوكوندريا

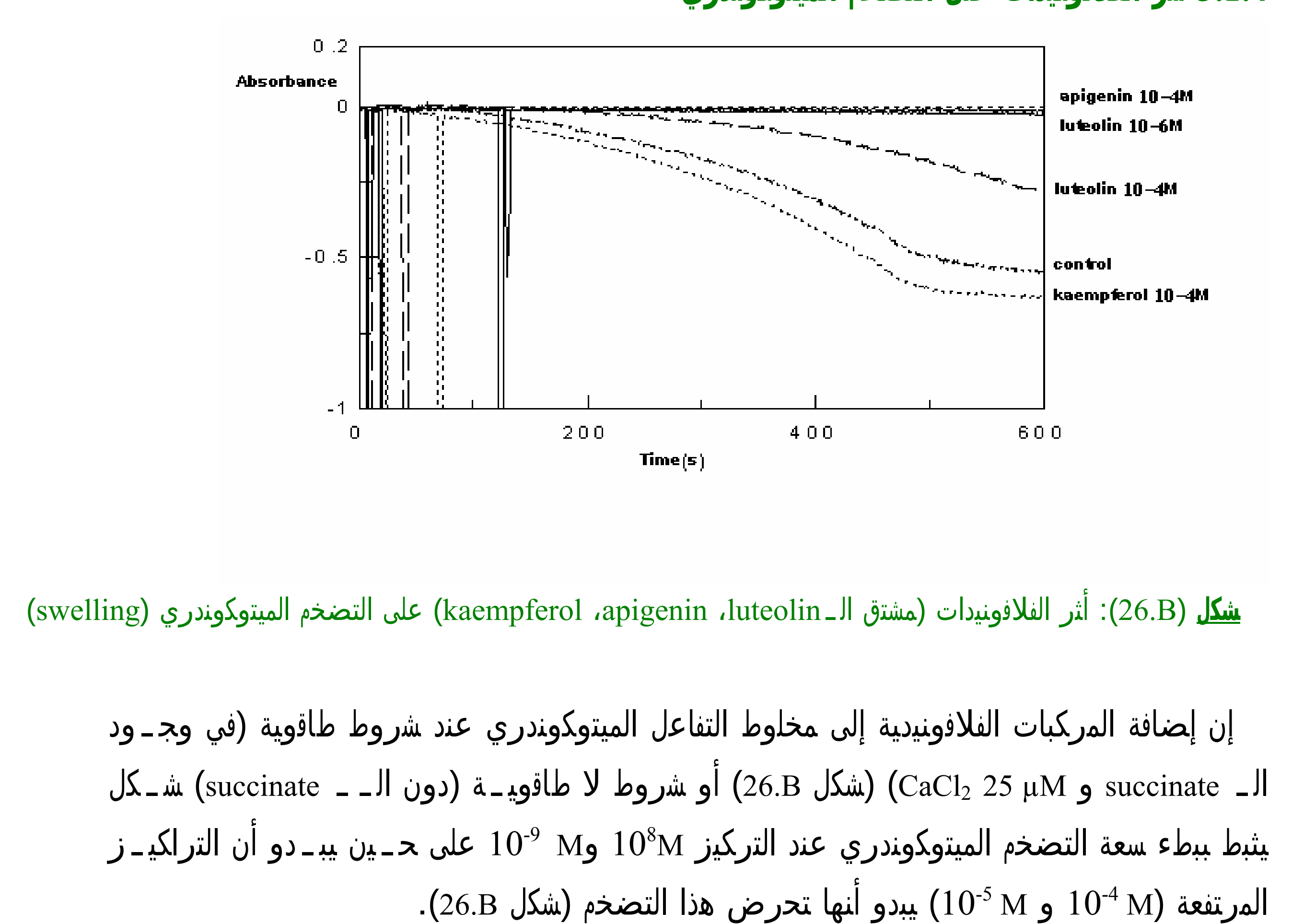
المركب (10^{-4} M)	الجهد الـ ـغشـ ـائي (% التثبيط)
Apigenin	(ns) 0.07± 4.0
8C2	(ns) 0.03±1.5
Kaempferol	(ns) 0.2 ±1.9

المتوسط ± S.D. ، (n= 3)

ns : غير معنوي

لم تبد الفلافونيدات تحت الدراسة أثرا يذكر عند التراكيز مابين M 10^{-4} وM 10^{-9} على الجهد الغشائي أحد مؤشرات الموت المبرمج (جدول7.B). كما لم تبدي هذه المركبات فعلا يذكر على المعقدات I، II ، III ، IV أو V عندما قورنت بالمثبطات النوعية.

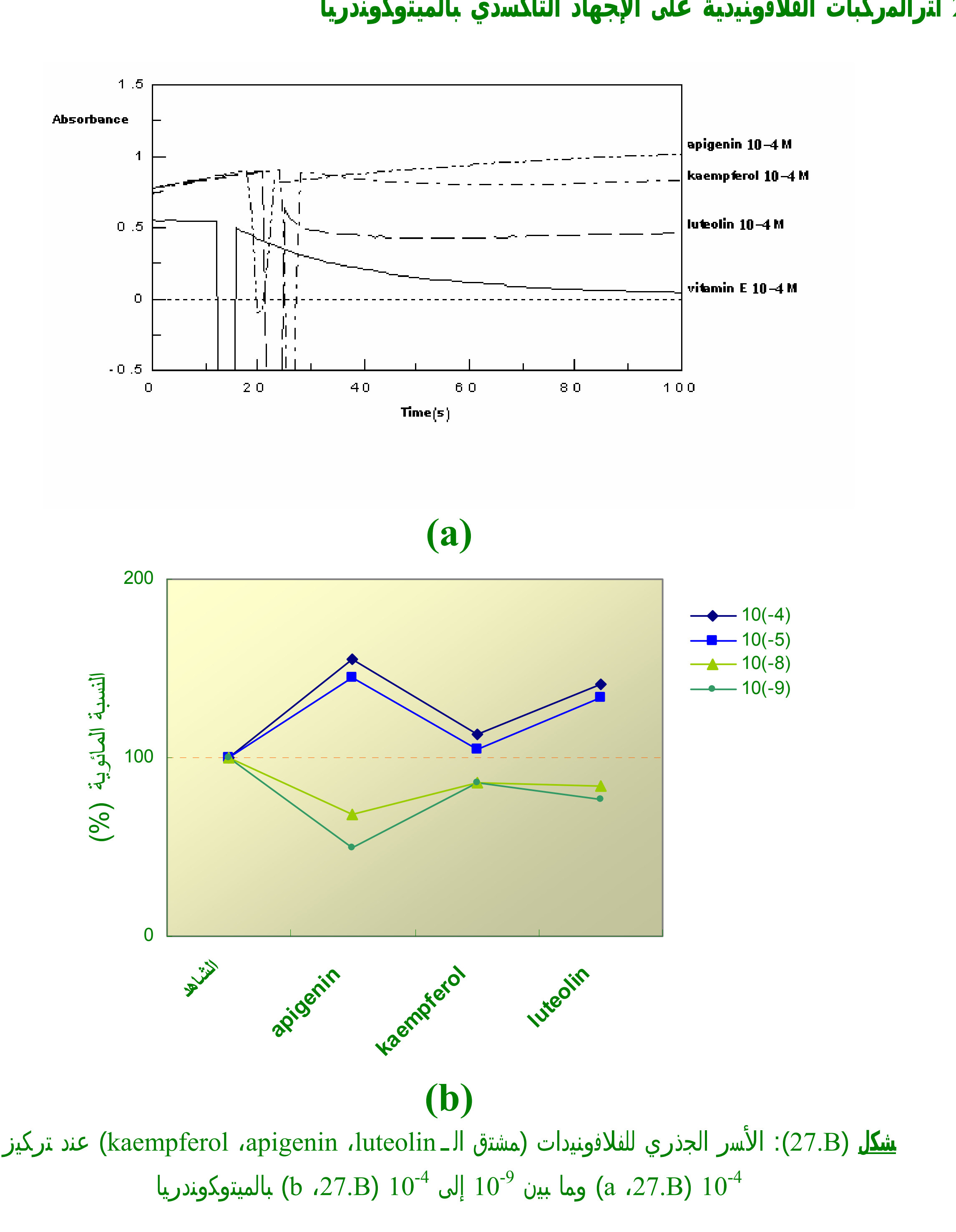
3.1.4 أثر الفلافونيدات على التضخم الميتوكوندري



شكل (26.B): أثر الفلافونيدات (مشتق الـ luteolin، apigenin، kaempferol) على التضخم الميتوكوندري (swelling)

إن إضافة المركبات الفلافونيدية إلى مخلوط التفاعل الميتوكوندري عند شروط طاقوية (في وجـود الـ succinate و 25 μM $CaCl_2$) (شكل 26.B) أو شروط لا طاقويـة (دون الـ ـ succinate) شـكل يثبط ببطء سعة التضخم الميتوكوندري عند التركيز 10^8M و10^{-9} M على حـين يبـدو أن التراكيـز المرتفعة (10^{-4} M و 10^{-5} M) يبدو أنها تحرض هذا التضخم (شكل 26.B).

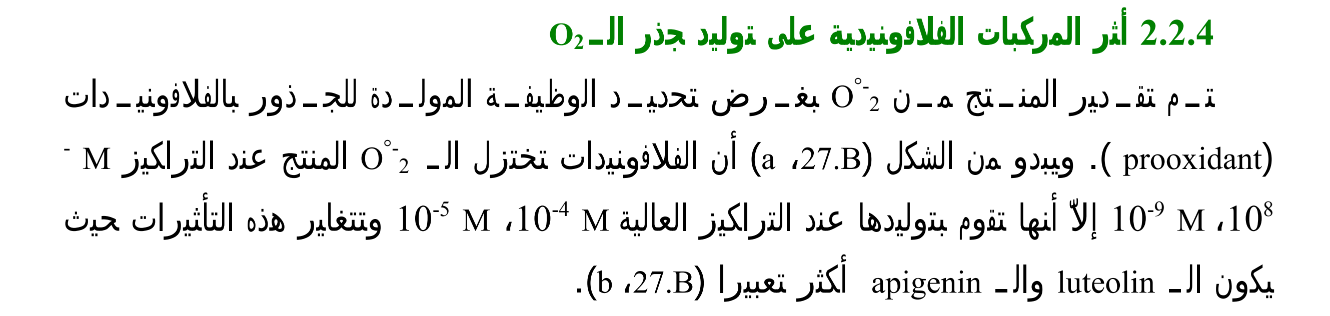
2.4 أثرالمركبات الفلافونيدية على الإجهاد التأكسدي بالميتوكوندريا



شكل (27.B): الأسر الجذري للفلافونيدات (مشتق الـluteolin، apigenin، kaempferol) عند تركيز 10^{-4} (27.B، a) وما بين 10^{-9} إلى 10^{-4} (27.B، b) بالميتوكوندريا

1.2.4 الأسرالجذري للمركبات الفلافونيدية

يبدو من الشكل (27.B، b) بأن كافة المركبات الفلافونيدية تحت الدراسة تمارس الـدور الآسـر للجـذرDPPH بفعاليـة عاليـة وقـد وجـد أنهـا تقـارب فعاليـة الـ ـvitamin E حيـث تكـافئ 10^{-4} M.



2.2.4 أثر المركبات الفلافونيدية على توليد جذر الـ O_2

تـم تقـدير المنـتج مـن $O^{\circ -}_2$ بغـرض تحديـد الوظيفـة المولـدة للجـذور بالفلافونيـدات (prooxidant). ويبدو من الشكل (27.B، a) أن الفلافونيدات تختزل الـ $O^{\circ -}_2$ المنتج عند التراكيز M 10^{-8}، M 10^{-9} إلاّ أنها تقوم بتوليدها عند التراكيز العالية M 10^{-4}، M 10^{-5} وتتغاير هذه التأثيرات حيث يكون الـ luteolin والـ apigenin أكثر تعبيرا (27.B، b).

3.2.4 أثرالمركبات الفلافونيدية على الأكسدة اللبيدية بالميتوكوندريا

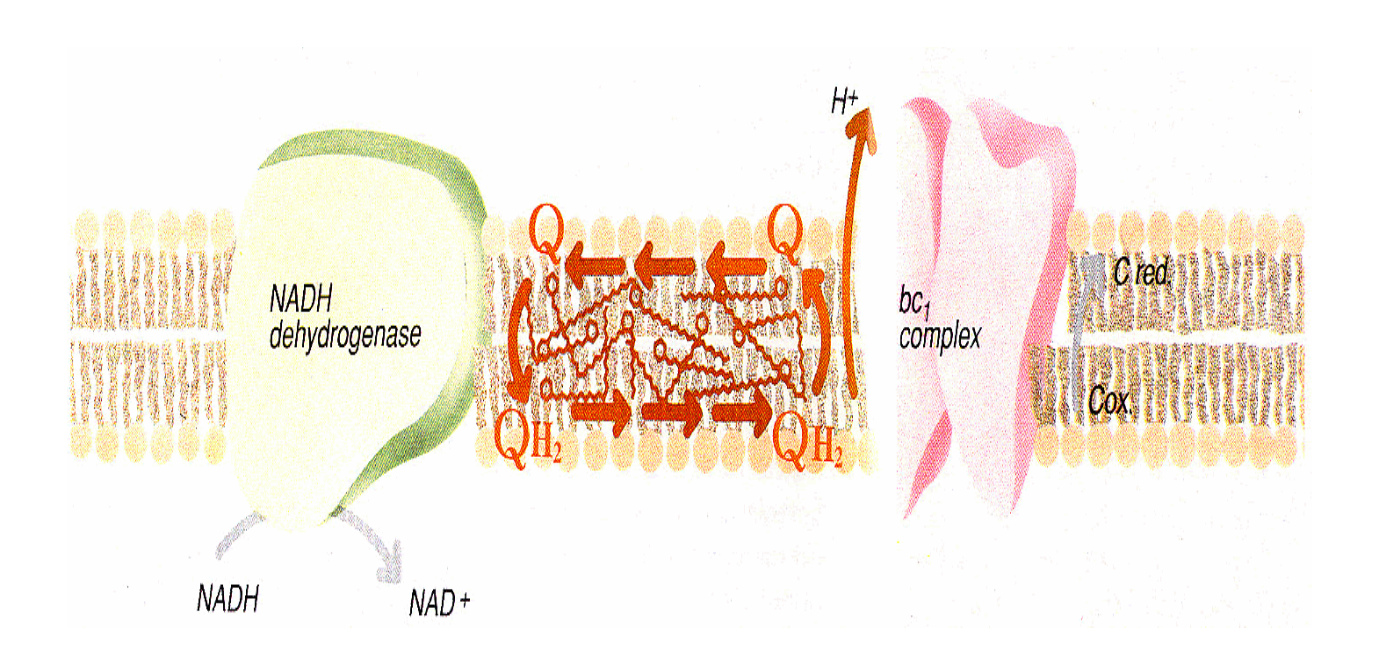
شكل (28.B): أثر الفلافونيدات (مشتق الـ luteolin، apigenin، kaempferol) علىالأكسدة اللبيدية بالميتوكوندريا

سجل بالشكل (28.B) بأن هذه المركبات الفلافونيدية تثبط الأكسدة اللبيدية الحادثـة علـى مسـتوى الأغشية المتوكوندرية بمعدل 90 % عند التركيز M 10^{-4} بالنسبة لكل من مشتق luteolin وapigenin وkaempferol

المناقشة

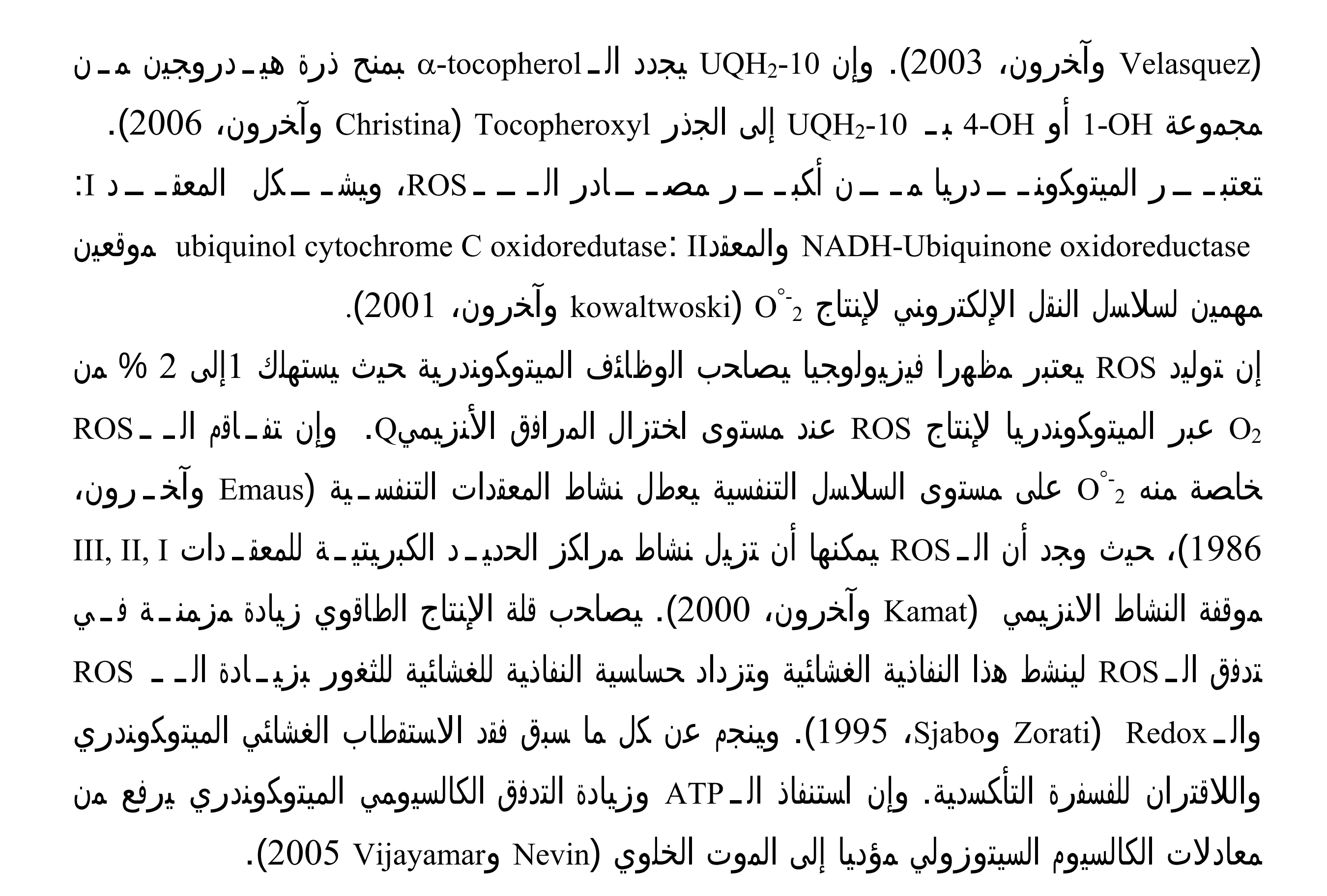
بينت دراساتنا *in vivo* إرتفاع معدلات UQ9 وUQ10 إثر تعاطي الجرذان للمستخلص البيتانولي *C. fuscatum* يمكن أن تفسر بأن المستخلص البيتانولي يملك مركبات فعالة من شانها أن تنشط الـدور الإختزالي للأنزيمات التنفسية الميتوكوندرية. ولتوضيح هذه الميكانزمات فإن الدراسات *in vitro* التـي تم إجراؤها على المركبات الفلافونيدية المعزولة من *C. fuscatum* أخضعت لإختبـار مـع عـزلات ميتوكوندرية بغية التعرف على التداخل الجزيئي بين هذه المركبات المحددة الهوية والنشـاط التنفسـي الجزيئي للميتوكوندريا.

يتخلق الـUQ عبر مسار أنزيمي يتوضع بالميتوكوندريا ويتمثل دوره الأساسي في تـأمين النقـل الإلكتروني للسلاسل التنفسية المتوضعة بهذه العضية ورفع معدلات إنتاج الطاقة والـATP وقـرن السلاسل التنفسية بالأكسدة الفوسفورية (Juong وآخرون، 2002). ويمكن لـUQ أن يتوضع بالثنائية الفوسفولبيدية الغشائية لأجهزة جولجي والميكروزومات. ويوجد الـUQ بصورة مختزلـة (% 70-80) من مجموع UQ بكل من الكبد و البلازما، بينما يشـكل (% 10-30) مـن بـاقي الأنسـجة (Daniel وآخرون، 2005).



شكل (29.B): الجهد الرودوكسي الإيبيكونولي

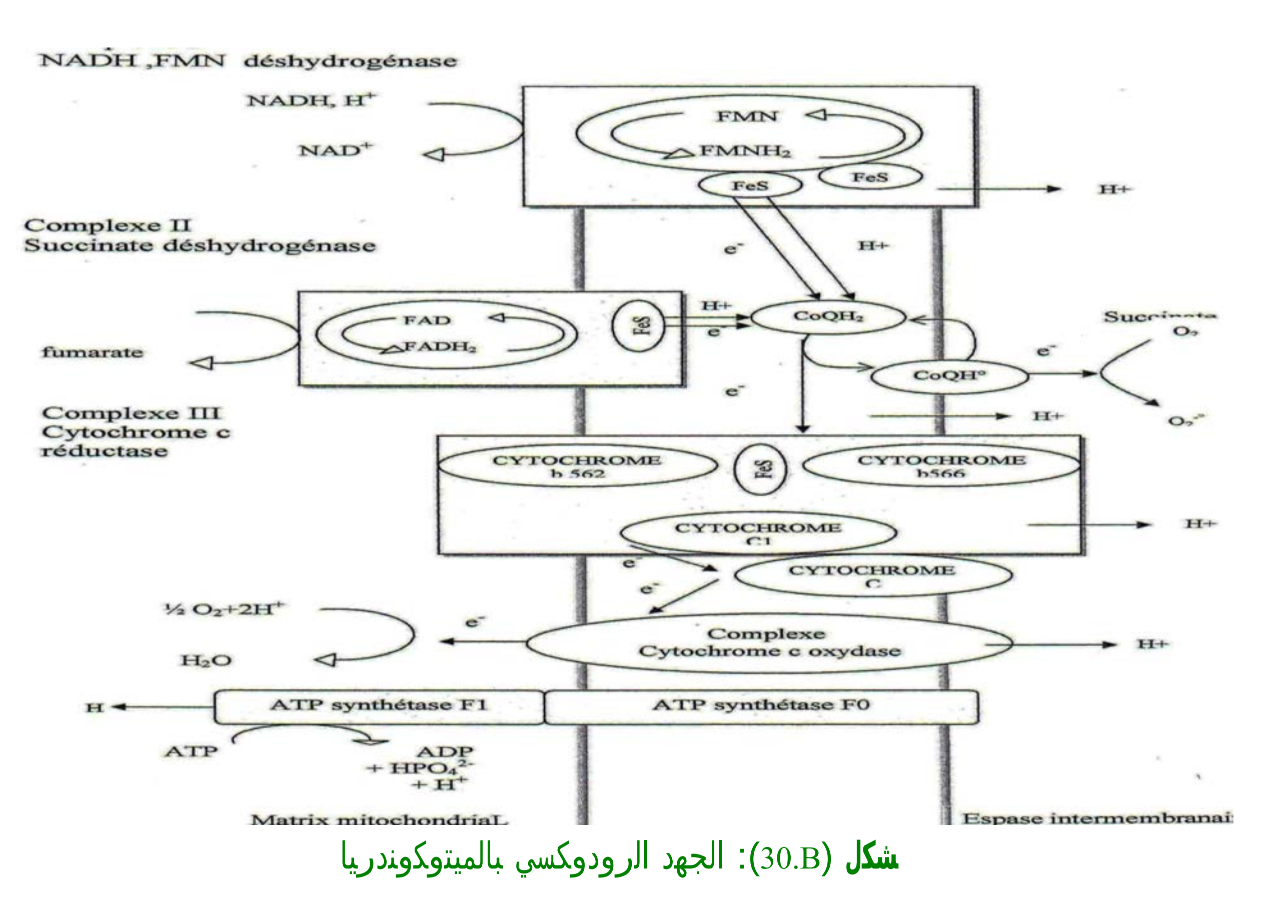
إن الصورة المختزلة لـ UQ يمكن تأمينها بتدخل الأنزيمات الميتوكوندرية التنفسية مثـل succinate dehydrogenase، NADH dehydrgenase وأيضا بتدخل DT-diapharase. وقد وجد أن منع الأكسـدة اللبيدية يؤمن بإستبعاد جذر البيروكسـيد اللبيـدي مباشـرة أو الجـذر $O^{\circ-}_2$ أو بتجديـد الفيتـامين E



(Velasquez وآخرون، 2003). وإن UQH2-10 يجدد الـ α-tocopherol بمنح ذرة هيـدروجين مـن مجموعة 1-OH أو 4-OH بـ UQH2-10 إلى الجذر Tocopheroxyl (Christina وآخرون، 2006).

تعتبـــر الميتوكونـــدريا مـــن أكبـــر مصـــادر الـــ ROS، ويشـــكل المعقـــد I: NADH-Ubiquinone oxidoreductase والمعقدII: ubiquinol cytochrome C oxidoredutase موقعين مهمين لسلاسل النقل الإلكتروني لإنتاج $O^{\circ -}_2$ (kowaltwoski وآخرون، 2001).

إن توليد ROS يعتبر مظهرا فيزيولوجيا يصاحب الوظائف الميتوكوندرية حيث يستهلك 1إلى 2 % من O_2 عبر الميتوكوندريا لإنتاج ROS عند مستوى اختزال المرافق الأنزيميQ. وإن تفـاقم الـ ROS خاصة منه $O^{\circ -}_2$ على مستوى السلاسل التنفسية يعطل نشاط المعقدات التنفسـية (Emaus وآخـرون، 1986)، حيث وجد أن الـ ROS يمكنها أن تزيل نشاط مراكز الحديـد الكبريتيـة للمعقـدات III, II, I موقفة النشاط الانزيمي (Kamat وآخرون، 2000). يصاحب قلة الإنتاج الطاقوي زيادة مزمنـة فـي تدفق الـ ROS لينشط هذا النفاذية الغشائية وتزداد حساسية النفاذية للغشائية للثغور بزيـادة الـ ROS والـ Redox (Zorati وSjabog، 1995). وينجم عن كل ما سبق فقد الاستقطاب الغشائي الميتوكوندري واللاقتران للفسفرة التأكسدية. وإن استنفاذ الـ ATP وزيادة التدفق الكالسيومي الميتوكوندري يرفع من معادلات الكالسيوم السيتوزولي مؤديا إلى الموت الخلوي (Nevin وVijayamar 2005).



شكل (30.B): الجهد الرودوكسي بالميتوكوندريا

إن الفلافونيدات قيد الإختبار(مشتق الـ luteolin و apigening وkaempferol) أمكنها رفع معدل الاستهلاك الأوكسجني (الطور3) ليقل أثر هذه المركبات عند التركيز $M\ 10^{-6}$ و 10^{-9} ، ويتزايد معدل P/O بهذه التراكيز المنخفضة ليقل عند التراكيز العالية 10^{-4} و10^{-5}. كماأمكن رصد الوظيفة المانعة للأكسدة لهذه الفلافونيدات حيث تم الإدلاء بأن التراكيز $M\ 10^{-5}$ و$M\ 10^{-4}$ تشكل الحد الأقصى للإستجابة.

أدلت الدراسات التحليلية على مستوى الشالكونات بأن الوظيفة اللاإقترانية تتوقف على :

1- طبيعة المستبدلات على مستوى النواة

2- مواقع المستبدلات على مستوى مختلف الأنوية (مثل الموقع C-2 و C-4 المزود بـ H أو OH بالنسبة للشالكون)،

وأن تموضع مستبدلات أخرى بهذه المواقع يفقدها وظيفتها. ويبدو أن هذه المواقع تتدخل في ميكانزيم تحويل أو نقل الـ H^+ داخل الغشاء الميتوكوندري الداخلي (Ravanal وآخرون، 1982).

لقد أبدى (Prostova وآخرون 2002) بأن الفلافوبروتينات (نظام المعقدات) تتدخل نمطيا في صورة FpI, FpII, FpIII ، وهي تملك مسالك ومواقع وظيفية ترتبط بطبيعة الفلافونيدات، حيث تتدخل الفلافونيدات على مستوى هذه المواقع مبدية دورا تثبيطيا بالفعل اللااقتراني ، إذ وجد مثلا أن rotenone يعتبر أحد المثبطات الإختيارية للمعقدات I (FpI) عند التراكيز $M\ 10^{-6}$و$M\ 10^{-5}$ وينعدم نشاطها على مستوى باقي المعقدات. وأكد (Kamat وآخرون، 2000) بأن بعض الفلافونيدات المعزولة من الأجزاء النباتية الهوائية تثبط النقل الإلكتروني بفعل المواقع المتعددة لمختلف الفلافوبروتين، حيث وجد أن الـKaempferol يؤثر إنتقائيا على FpI. وأشار(Siess وآخرون، 2000) إلى أن الفلافونات ذات أثر انتقائي على FpIII. علما أن FpI من أكثر الفلافوبروتينات الأكثر حساسية للمثبطات (Crampton ، 1999). وذكر بأن المعقد II (FPII) الناقل للمكافئات المختزلة المحرض على أكسدة السكسينات يكون أقل حساسية للفلافونيدات عكس ما أمكن تسجيله مع بعض الفينولات الكلورية (Shoffner وWalace ، 1994).



شكل (31.B): أثر الفلافونيدات على النقل الإلكتروني على مستوى الميتوكوندريا (Ravanel وآخرون، 1983)

ويمكن من خلال هذا الإشارة إلى أن الأختلالات الحادثة على مستوى النقل الطاقوي مردها إلى بـطء السيولة الغشائية، أي أن تأثير الفلافونيدات عند التراكيز العالية قد يكون له علاقة بتنـاقص السـيولة الغشائية. وذكر(Torel ، 1986) أن الفلافـون platonatine ذو دور تثبيطـي للميتوكونـدريا يـرتبط بخصوصية الجهد الرودوسكي وذوبانية دهنية ترتبط بالسلاسل 6 isoprenyl والـ OH المتموقع على C-5 وC-8، مما يجعلنا نقترح أن الفلافونول يمكنه أن يستبدل بالـubiquinone المابين غشائي ويسمح بـإنتشار الـ H^+ والمرور المباشر للإلكترونات على الـO_2 حيث يتمكن مثل هذا المركب من الذوبان مباشرة بالطور اللبيدي الغشائي محدثا التسمم بالأغشية البيولوجية (Ravanel وآخرون، 1983).

إن نتائج دراستنا الحالية والتي أبدت بأن التراكيز العالية $M\ 10^{-4}$، $M\ 10^{-5}$ خاصة مشـتق الـ ـ luteolin والـapigenin تؤدي إلى إحداث swelling الذي يصاحبه انخفاض بالجهد الغشائي ويتسـبب في فتح الـثغور الغشائية (PTP) بينما أبدت التراكيز المنخفضة 10^{-8}، $M\ 10^{-9}$ الإقـلال مـن معـدل التضخم الميتوكوندري. لعل هذا الدور الثنائي لبعض المركبات تحت الإختبار قد يعود سببه إلى التعقيد البنيوي لجزيئات الـPTP، حيث أنه يحكمها فعاليات الـRedox (Galesteo وآخرون، 2006).

إن إحداث الـswelling له علاقة بفتح الـPTP الذي قد يعود إلى أكسدة الثيولات البروتينيـة للغشـاء الميتوكوندري، حيث وجد بأن adenine nucleotide translacase قد يكون مسؤولا عن فتح الـ ـ PTP (Quan وآخرون، 2006). ويتوقف هذا على توافر الـROS وفقا لفعاليات الـFenton التي تعتمد على

الاختزال الأنزيمي لـ H_2O_2 إلى $OH^{°}$ بواسطة أكسدة الـ Fe^{+2} إلى Fe^{+3}. وقد يكـون هـذا السـبب والتفاعل مع H_2O_2 المولد لـ $OH^{°}$ وهو الجذر الشديد التأثير الذي قد يتسبب فـي أكسـدة المجـاميع الثيولية مؤديا إلى فتح الثغور في وجود Ca^{++} (Prostova وآخرون، 2002). ويهـتم التفسـيرالجزيئي بالمجاميع الهيدروكسيلية بالحلقات العطرية التي قد تكون مسؤولة عن إحداث الـ swelling. ويظهـر أن هذه الفعالية تكون أبلغ عندما تحتل هذه المجاميع الهيدروكسيلية الموقع para أكثـر منـه بالنسـبة للموقع ortho، ويتطلب هذا أيضا وجود المجموعة المانحة للإلكترون بالموقع ortho قريبا من الوظيفة الهيدروكسيلية (Skuluchev ، 1998). إن أهمية هذه الدراسة هي أن المركبات تحت الإختبار والتـي أبدت سلوكا محرضا لـ Swelling وفتح الـPTP خاصة عند التراكيـز العاليـة يمكـن أن تسـتغل كميكانيزم للقتل الخلوي ومضاد للاورام الخاصة بتجارب الـcytoxicity. بينما يحتفظ بالمركبات التي أبدت فعالية مضادات الأكسدة بتراكيز منخفضة لأجل الدور الوقائي.

تؤكد نتائج هذه الدراسة الفعالية المضادة للأكسدة المتوخاة من الفلافونيدات، فحسب Daniel وآخـرون (2005) فإن المركبات الفلافونيدية تمارس الدور الوقائي من الـROS عن طريق الأسـرالجذري أو عن طريق مخلبة المعادن (أيونات الحديد أو النحاس) أو بتثبيط الــ oxidases. و يبـدو أن التموقـع الهيدروكسيلي بالفلافونيدات يعزز كثيرا هذه الفعاليات. إن تحريض النفاذية الميتوكوندرية يزامن الكثير من الحوادث الخلوية، وقد ينجم عنه الفقد السريع للجهد الغشائي التنفسي اللاإقتراني وكذا تثبط تخليـق ATP (Guntupalli وآخرون، 2006).

إن نتائج هذه الدراسة المعتمدة على اختيار فعالية كل مـن luteolin وapigenin وkaempferol أبدت بأنها تلعب دورا مضاعفا، حيث أنها ذات دور مضاد للاكسدة عند التراكيز المنخفضة المنحصرة ما بين 10^{-9} M و10^{-6} M ودور مولد جذري عند التراكيز الأعلى من 10^{-5} M. تتفق نتائجنا هذه مع ما نشر في هذا المجال، حيث أدلى الكثير من الباحثين بأن ذات الفلافونيد يسلك مسلك الآسـر والمولـد الجذري معتمدا على تركيز ومصدرهذه الجذور (Morin وآخرون، 2001)؛ حيث أن الفلافونيد الـذي يسلك مسلك المضاد للأكسدة يمكنه أن يتحول إلى pro-oxidant عند نقل أحـد المعـادن، إذ وجـد أن الفلافونات والفلافانونات المزودة بالمستبدل OH تبدي هـذين المسـلكين علـى حـد سـواء (Halka وآخرون، 2005) . لقد أشار (Guohua وآخرون، 1997) بأن الفلافونيدات يغلب عليها دور المولـد الجذري في حالة تواجد Cu^{+2} (Valkoوآخرون،2006).

تنظم الميتوكوندريا الكالسيوم الداخل خلوي ومن خلال حالات الإجهاد يتسرب الـROS بكميات عالية، حيث يمكن أن يولّد الـ $O^{°-}_2$ من المعقدات I و III بالسلاسل التنفسية. إن تدخل الفلافونيدات لردع هذا التسرب قد يساهم في تأسيس الجانب الوقائي للخلية، حيث أمكن الإستدلال بشكل جازم علـى العلاقـة بين الجهد الغشائي الميتوكوندري وإنتاج الـROS (Jamshindzadeh وآخرون، 2005).

إن من أهم الميكانيزمات لتفعيل الدور الوقائي هو العلاقة المباشرة بين الفلافونيد والأسر الجذري على مستوى الميتوكوندريا أو بفضل لإقتران الطور التنفسي الرابع للاكسدة الفوسفورية، أو عـن طريـق تثبيط مواقع التسرب الإلكتروني). تكمن أهمية هذه الدراسة في كون المركبات تحت الإختبار والتـي أبدت سلوكا محرضا لـ swelling وفتح الـPTP بالتراكيز العالية يمكن أن تستغل كميكـانيزم القتـل الخلوي والفعل المضاد للاورام في تجارب الـcytotoxicity بينما يحتفظ بذات المركبات عند التراكيز المنخفضة لأجل الدور الوقائي.

الخلاصة

إهتم هذا الباب بإختبار فعالية 8C2 المعـزول مـن *C. fuscatum* وكـذا فعاليـة كـل مـن الـapigenin والـkaempferol على الجهد الرودوكسي ووظائف العزلات الميتوكوندريا من كبـد الجرذان.

- عكست هذه الدراسة بأن هذه الفلافونيدات تتدخل وفقا لآلية تثبيط الأكسدة الفوسـفورية (الطـور4) وتسريع الطور3، على إنخفاض الـRC عند التراكيز (0.01-0.1 mM).

- يخفض 8C1 بشكل ملحوظ الـswelling عند 10^{-8} M و 10^{-9} M بينما تحرض التركيز المرتفعة من آلية الموت المبرمج.

- لم يسجل أثر يذكر بهذه الفلافونيدات على الجهد الغشائي أو على النظام الرودوكسي للمعقدات I إلى IV .

- إستجابت هذه المركبات بشكل معتبر لأسر جذر الـ$O_2^{°-}$ وخفـض معـدل الـ LPO بـالتراكيز المنخفضة لتتحول إلى طلائع مؤكسدة بالتراكيز الأعلى.

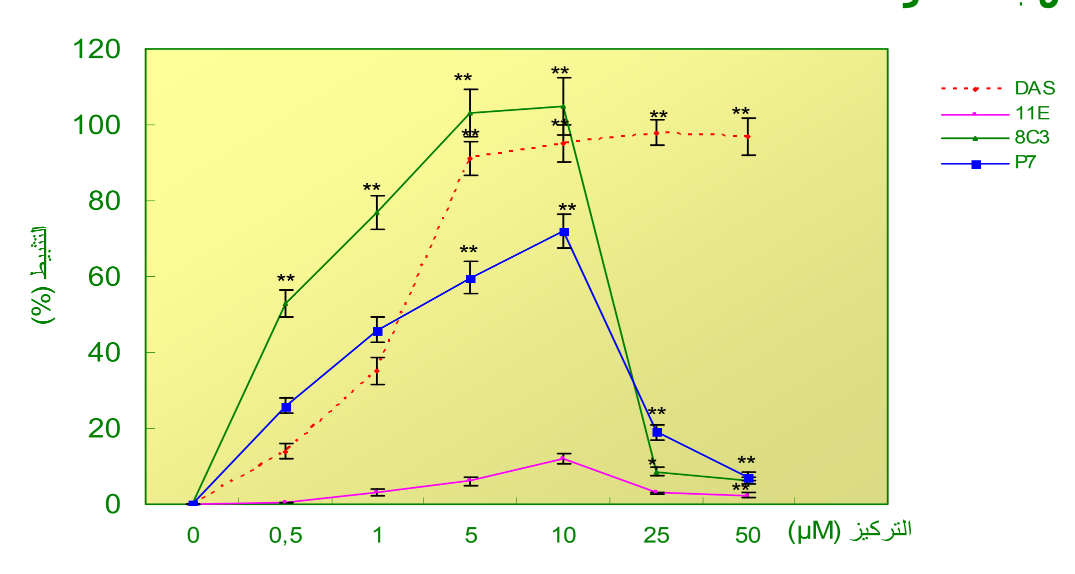
يسـتنتج مـن هـذا 8C2 إلـى جانـب الـ apigenin و الـ kaempferol تمـارس دورا وقائيا عبر آلية اسر الجذور المولّدة بالميتوكوندريا ويقتصر ذلك على التراكيز المنخفضة.

5.أثر المستخلص البيتانولي لـ*C. fuscatum*على الجهد الرودوكسي الميكروزومي

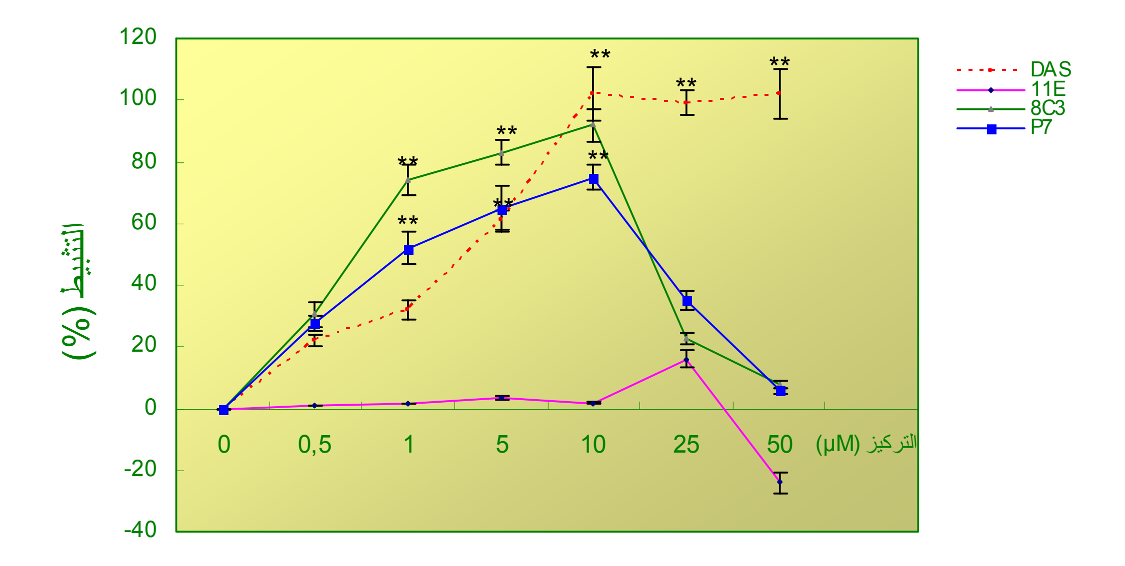
النسب التثبيطية (%) للمستخلص البيتانولي *C. fuscatum* (CYP)				
المجموعة	**الشاهد**	**DAS**	**200 mg/Kg**	**400 mg/Kg**
AH	**100**	**95**	**29**	**50**
PPN-H	**100**	**112**	**24**	**54**
ERMD	**100**	**26**	**17**	**24**
EH	**100**	**30**	**18**	**29**

تدلي نتائج دراسات الفعل التثبيطي *in vivo* للأنشطة الميكروزومية المحرضة بأن نشاط الـ aniline hydroxylase (AH) وp.nitrophenol hydroxylase (PNP-H) و erythromycine (ERMD) demethylase قد ارتفع إثر معاملة الجرذان *in vivo* بـ INH وRMP (150 mg يوميا لمدة 3أيام) من 0.55 nM/min/mg protein ، 2.2 ، 0.43 إلى 1.85 nM/min/mg protein ،3.83 ، 0.68 على التوالي (شكل32.B). كما تدلي نتائج هذه الدراسة بأن الميكروزومات المتحصل عليها من جرذان عومات بشكل متزامن بكل من INH وRMP و كذا 200 mg/ kg أو 400 mg/kg من المستخلص البيتانولي *C. fuscatum*. قد أبدت أن الإستجابة لم تزد عن (% 24-29) بالنسبة لنشاط كل من AH وPPN-H عند التركيز 200 mg/Kg بينما سجلت إستجابة قدرها (% 44-55) عند 400 mg/Kg. (شكل32.B، a). بينما لم تزد إستجابة الـERMD عن 24% ونشط الـ epoxide hydroxylase بما يكافئ 29% عندما تناولت الجرذان 400 mg/kg من المستخلص البيتانولي (شكل32.B، b).

1.5 الأثر التثبيطي *in vitro* للفلافونيدات المعزولة من *C. fuscatum* على النشاط الميكروزومي المحرض بـ INH وRMP



(a)



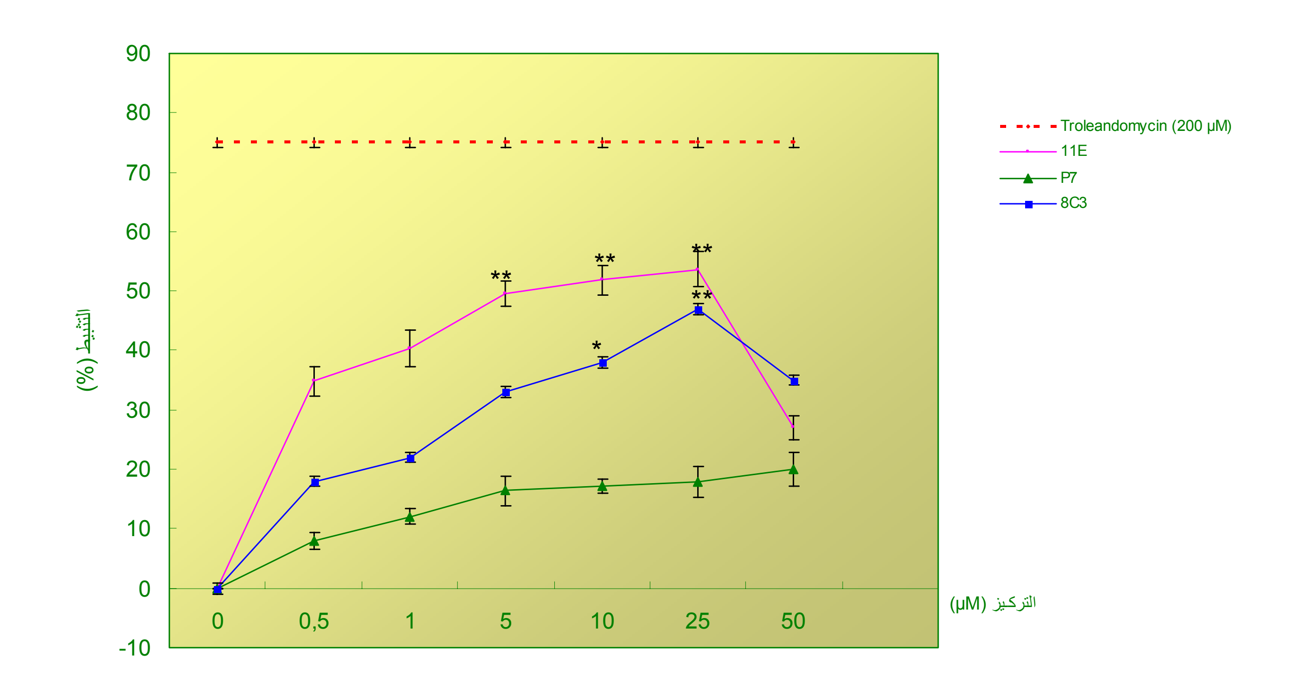
(c)

شكل (33.B) الأثر التثبيطي *in vitro* للمركبات الفلافونيدية المعزولة من *C. fuscatum* على النشاط الميكروزومي AH لـ CYP2E1 (33.B ،a) و Western blot (33.B ،b) والنشاط الميكروزومي PPN-H (33.B ،c)

$n = 3 \pm SD$; $P^* < 0.01$; $P^{**} < 0.05$

النسبة التثبيطية (%) : $A_0 - A_1 / A_0 - A_C \times 100$

حيث A_0 = المعاملة ، A_1 = العينة ، A_c = الشاهد



(a)

<u>**شكل**</u> (34.B): الأثر التثبيطي للمركبات الفلافونيدية المفصولة من *C. fuscatum* على CYP3A4

n = 6 ± SD; P*<0.01; P**<0.05

النسبة التثبيطية (%) : A_0-A_1/A_0-A_C x 100

حيث A_0 = المعاملة ، A_1 = العينة ، A_c = الشاهد

تدلي نتائج هذه الدراسة (شكل33.B، a وc) بأن الـ DAS لا يظهر أثرا تثبيطيا واضحا عند التركيز 0,5 µM لنشاط PNP-H حيث لم يزد عن (22.9 %)، إلا أنه ارتفع إلى(% 35-32) بالنسبة لنشاط كـل من AH و PNP-H على التوالي عند التركيزµM 1. كما تدلي النتائج بأن التركيز ما بين (5-25 µM) يعتبر المجال الأمثل للأثر التثبيطي على نشاط كل مـن AH وPNP-H حيـث انحصـر مـا بـين (91-102 %).

كما تدلي الأشكال (33.B،a وc) التي تعكس الأثر التثبيطـي لمفعـول الفلافونيـدات المفصـولة من *C. fuscatum* على النشاط الميكروزومي بالعزلات الكبدية المحرضة بـINH وRMP بأن المركب 11E يبدوأنه ضعيف التأثير على نشاط كل من AH وPNP-H حيث ينحصر الفعل التثبيطي مـا بـين (0.6-16 %) عندما عولجت الميكروزومات بتركيز قدره (0.5-25 µM). وسجل أن رفع التركيزعن µM 25 أدى إلى التثبيط الميكروزومي (24-25 %).يبدو من هذه النتائج أيضا أن المركب 8C3 أبدى فعالية تثبيطية عالية تنحصر ما بين المجال التركيـزي (0.5-10 µM)، حيـث قـدرت بـ (56-103 %)،

(72- 89%) لكل من AH وPNP-H على التوالي. ولم يسجل أثر يذكر بعد ذلك حتى عند التركيز 50µM. كما أبدى المركب P7 أيضا فعلا تثبيطيا واضحا بدءا من التركيز 1 µM ولكن تطلب تأثيره مجالا أوسع انحصر ما بين (1- 10µM) سجل خلاله فعل تثبيطي قدره (% 53-75)، (% 51-65) على نشاط كل من AH وPNP-H على التوالي (33.B).

إذا ما فحصنا أثر هذه المركبات الثلاث على نشاط ERMD شكل (34.B، a) فإننا نجد أن المركب 11E قد أبدى فعالية تثبيطية بنسبة قدرت بـ34.8% عند التركيز 0.5 µM و تدرجت في التأثير التثبيطي بتزايد التركيز ليسجل أقصى فعل تثبيطي (% 53.7) عند التركيز 25 µM، ولم يسجل بعد ذلك أثر يذكر. وتدلي نتائج هذه الدراسة بأن الأثر التثبيطي للمركب 8C3 بقي محدودا (45%). ولم يسجل المركب III أثرا تثبيطيا يذكر (% 6-15) شكل (34.B، a).

ويؤكد هذا نتائج تحاليل الـWestern blot بالميكروزومات الذي يحدد وجود عصابات تتبين بها فروق الأوزان الجزيئية للعينات المعاملة بالـ INH أو الـ RMP والمركبات المفصولة من *C. fuscatum* حيث يكون التحريض أوضح بكل من INH و RMP شكل (33.B ، b و 34.B ، b).

المناقشة

بعض من الأنظمة وحتى بعض الظروف الفزيومرضية يمكن أن تنعكس على الأنزيمات السيتوكرومية محرضة إياها. وهذا التحريض يمكن أن يؤزم الوضع السمي للخلية بالنسبة للعديد من المركبات xenobiotic إنطلاقا من تثبيط أوتراكم مستقلباتها (Michiharu وآخرون، 2005). كما يمكن لهذه السيتوكرومات المحرضة أن تكون مصدرا للعديد من الأنواع الأوكسيجينية النشطة (ROS) داخل الخلية الكبدية المحرضة بشكل حاد أو مزمن بالأدوية (Robert وHuang، 1998) مؤديا بذلك إلى أكسدة اللبيدات الغشائية وإستنفاذ الجلوتاتيون مما يتطور بالوضع إلى إحداث حالة التهاب كبدي (Loguericio وAlessandro، 2003). يحرض الـRMP العديد من الإنزيمات السيتوكرومية ويستجيب الـCYP3A4 بشكل نوعي له (Ndanusa وآخرون، 1997). ويعتبر الـ CYP3A4 الأكثر إنتشارا بالخلية الكبدية حيث يشكل (% 30-40) من باقي الأنزيمات السيتوكرومية (Forster وآخرون، 2003). على حين يحرض الـINH الـ CYP2E1 والذي يشكل 7% من هذا النظام (Pierre وآخرون، 1998). وباعتبار أن تثبيط هذه الأنزيمات السيتوكرومية قد يحد من انتشار الـROS وبالتالي يحد من الفعل السمي فإن اختبار فعالية المستخلص البيتانولي لـ*C. fuscatum* وحتى بعض المركبات المفصولة منه يشكل محورا مهما لتحديد بعض ميكانزمات الفعل الوقائي إلى جانب الفعل المضاد للأكسدة.

ولتحقيق ذلك وباعتبار أن نشاط (AH) Aniline hydroxylase وكذا4-nitrophenol hydroxylase يرتبطان بنشاط الـ CYP2E1 المحرض بـ INH (Jeong وآخرون، 2002). كما أن الـ erythromycine demethylase (ERMD) يرتبط بنشاط الـ CYP3A4 المحرض بـ RMP

(Wietholtz وآخرون، 1995) فقد تم استعمالهم تجريبيا لتحديد فعالية النبتة تحت الدراسة. وقد أدلـت النتائج بأن *C. fuscatum* تتمتع بقوة تثبيطية معتبرة لنشاط CYP2E1 المؤكد باختبار نشـاط (AH) و (PPN-H)على حد سواء. ويتجلى هذا الأثر خاصة عند الجرعة 400 mg/kg (% 51-44)، وهو بـذلك يقارب أثر المثبط المرجعي diallyl sulfide (DAS) والذي عرف بأنه مركب من حمـض الجارليـك المثبط النوعي لـ CYP2E1 (Brady وآخرون، 1998). وبالنسبة لأثر هذا المستخلص البيتانولي على نشاط CYP3A4 (*in vivo*) فقد بدا منخفضا حيث لم يزد عن % 29 حتى عنـد الجرعـة 400 mg/kg.

ولتفسير الفعالية التثبيطية لهذا المستخلص البيتانولي تم اختبار فعالية المركبات الثلاث المفصولة من *C. fuscatum* . وأوضحت نتائج هذه الدراسة بأن كل من المركب 8C3 وP73 يثبط نوعيا نشاط CYP2E1 وفقا لنتائج الاستجابة المعتبرة لنشاط كل من AH وPNP-H. إلاّ أن هذه الاستجابة وجد أنّهـا تتفـاوت بتفاوت التركيز المسلط على النشاط الميكروزومي، حيث اعتبر المجال(5-10µM) اقل مجـال للتـأثير التثبيطي حيث بلغ (% 103-97) بالنسبة للمركب 8C3 بينما تطلب فعل المركب P73 مجالا أوسـع (-5 25 µM) لإحداث استجابة لذات النشاط (% 99-59). ويبدو من هذا أن المركب 8C3 أبلغ فـي التـأثير لكونه يبدي فعالية معتبرة عند تركيز أقل. على حين لم يبد المركب 11E أية فعالية تثبيطيـة بالنسـبة لـ CYP2E1 عند المجال (µM 10-25)، بل أبدى فعالية تحريضية بعد هـذا المجـال أي عنـد (-50 100µM) تجلت خاصة عند اختبار الاستجابة على PNP-H. إن المركبين 8C3 و P73 اللذين تجاوبـا مع CYP2E1 لم يبديا نفس التجاوب مع ERMD المحرض بـ RMP خاصة. على حين انفرد المركب 11E بالأثر التثبيطي على هذا النشاط الميكروزومي وانحصر تأثيره بالمجال التركيـزي (µM 10-5). كما يتدخل هذا المركب في حفظ epoxide hydroxylase من الإستنفاذ بما يكافئ 62 %. لقد تضاربت المفاهيم كثيرا حول ميكانزم تداخل الفلافونيـدات مـع الأنشـطة السـيتوكرومية، حيـث أن قابليـة الفلافونيدات لأن تسلك مسلك مواد تفاعل لانزيمات الـ CYP يبدو أنه غاية في التعقيد، فقـد يخضـع لتركيب وهيكلة الفلافونيد ذاته أو لتركيزه وللنشاط الانزيمي. وقد يحكم كل هذا طريقة الإدخال وكيفية التناول(Yasuna وآخرون، 2001).

ولقد أدلت الدراسات بأن الغذاء المدعم بالفلافونيدات يتدخل في تنظيم نشاط الـ monoxygenase والـ transferase (Siess وآخرون،1989). وأشار Chae وآخـرون (1991) بـأن سـيتوكرومات الجرذان المحرضة بـ tetrachlordibenzapidioxin (TCDP) وخاصة منها CYPA1 المتوقـف علـى نشـاط 7-ethoxy resorufin *O*-deethylase (EROD) قـد أبـدت اسـتجابة تثبيطيـة لمفعـول 7, hydoxyflavone و naphtaflavone مقارنة بالـ quercetin الذي عجز عن تحقيق ذلـك. كمـا أدلـت دراسات Jong وآخرون (2005) بأن الـ quercetin يبطئ إنتاج p-nitrophenol عند مجال تركيـزي (1-10 µM) بينما يسرع من ذلك التركيز الأعلى. أما Obermier وآخرون (1995) فقد ذكـروا بـأن الفلافون يكون ذو فعل تثبيطي أكبر مقارنة بالفلافانون وأن الـ flavonoligans يثبط بفعاليـة معتبـرة

نشاط CYP2D6 عند تراكيز عالية، إلاّ أنّه يعجز عن تحقيق ذلك بالنسبة لنشاط CYP2E1 مهما ارتفع التركيز. ويذهب Siess وآخرون (1995) إلى أن التركيز يمكن أن يغير اتجاه النشاط التحريضـي أو التثبيطي، حيث وجدوا بأن 5.6 benzoflavone يمكن أن يرفع نشاط benzyloxure-*O*-dealkylase عند التركيز 2 µM، ورفع التركيز عن هذا الحد ينقلب إلى الفعل التثبيطـي. ويؤيـدهم فـي ذلـك Judy وآخرون(2004) الذين أدلوا بأن 7,8 benzoflavone يعتبر مثبطا انتقائيا لنشاط CYP1A1 عند التركيز (1-10 µM) ويمكن لذات الفلافونيد أن يسلك سلوكا تحريضيا عند التركيز(10-100 µM) على نشـاط CYP2E1.

إلى جانب تدخل عامل التركيز في تحديد طبيعة الفعالية فإن العديد من الباحثين اجمعوا علـى أن الفلافونيدات عديدات الهيدروكسـيد (quercetin) لا تبـدي فعـلا تثبيطيـا للنشـاط الميكروزومـي (Pachaikani وآخرون، 1988). ولتفسير ذلك تم الإهتمام بمفهوم العلاقة بين البنية الهيكلية والوظيفـة والتي أدلت بأن التموقع الهيدروكسيلي على 'C-3 و'C-4 للفلافون يختزل الوظيفة التثبيطية للـEROD وأن وجود الرابطة β وγ يرفع الفعالية التثبيطية للشالكونات (Miroslov وآخرون،2001). كما ذهب Iwata وآخرون (2004) بأن الأثر التثبيطي يحكمه أيضا الرابطة C-2 وC-3 بالحلقة C وأن الإتجـاه نحو الميثلة يحفز هذا الفعل التثبيطي. ويؤكد Siess وآخرون (1995) بأن مجـاميع الهيدروكسـيل أو الميتوكسيل كمستبدلات على المواقع'C-3 و'C-4 تعتبر محـددات انتقائيـة للفعـل التثبيطـي لنشـاط CYP450. قد يعود الإختلاف في مدى استجابة نشاط CYP2E1 و CYP3A4 بدراسـتنا للمسـتخلص البيتانولي *C. fuscatum* أو للمركبات المفصولة منه إلى اختلاف المسارات الميتابولزميـة التـي قـد تتداخل مع المواقع والمراكز النشطة بالأنزيمات مما يؤدي إلى عمليـة suppression لـ CYP2E1 والذي قد يحدث بفعل تنشيط transciptional وعـدم التنشـيط البروتينـي لـ CYP2E1 (Sapone وآخرون، 1998). بينما أشار سابقا Huang وآخرون (1983) بأن الفلافونيدات تسهل التـداخل بـين NADHP450 والسيتوكرروم P450 oxidoreductase. لقد اهتم الكثير من البـاحثين بالفعـل التثبيطـي للفلافونيدات كأحد الميكانيزمات المحددة للفعل السمي، حيث وجـد Burk وآخـرون (1994) بـأن المسـتخلص المـائي لـ *Thominigia sanguina* أبـدى فعـلا تثبيطيـا علـى كـل مـن Benzyl xresorufin-*O*-dealkylase (BROD) المتوقـف علـى نشـاط CYP2C11 و 7- (EROD) ethoxy resorufin-*O*-dealkylase المتوقف على CYP2C6 بما يكافئ 18-19% على التـوالي. إلا أن نفس المستخلص قد أدى إلى تحريض ERMD المتوقف على نشاط CYP3A4. وأهتم Bok وآخرون (2000) بالفعل التثبيطي لـα-naphtaflavone المفصول من المسـتخلص الجـذري لـ *Scutelaria baicalensis* على نشاط كل من CYP3A4 و CYP1A2 بكبد الجرذان المحرضة بـCCl_4 والذي وجد انه يكافئ (IC_{50} = 0.1- 5 µM).

وركّـــز Jeong وآخـــرون (2002) علـــى دراســـة الفعـــل التثبيطـــي لأحـــد الأجليكونـــات 18 β-glycyrhetinic acid على نشاط CYP2E1 أيضا بكبد الجرذان المحرضة بـ CCl_4 وأدلى بأنه قد أبدى استجابة تثبيطية معتبرة.

إن الفعل التثبيطي للأنشطة الميكروزومية يعتبر أحد الميكنزمات غير المباشرة التـي تعـزز الفعـل المضاد للأكسدة. حيث ذكر(Hamed وآخرون، 2000) بأن تثبيط CYP2E1 يصاحبه اختزال معدلات الـ ROS.

كما ظهر من نتائج هذه الدراسة بان هذا لفعل يتجلى أكثر بالدراسات *in vitro* مقارنة بالدراسـات *in vivo*. ولعلّ هذا مرده إلى ما فسره (Ameer وآخرون، 1966) والذي أدلى بأن وجود الجلوسيدات على الفلافونيدات يتأثر في حالة الـ *in vivo* حيث يمكن أن يخضع لفعاليات deglycosylation بفضـل البكتريا. ويمكن أن يتم الفعل التثبيطي للسيتوكرومات وفقا لثلاث آليات (Strandell وآخرون، 2004)، وأكثرالآليات التي حظيت بدراسات وافية هـو مفهـوم الأكلـة Alkylation للنيتـروجين البيرولـي (Kanokwan وآخرون، 2006) بمجموعة الهيم البروستيكية بواسطة أيضيات وسطية مثـل: olefind، acetylenes، dihydropyridines، (Meredith وآخرون، 2003). بينما يتضمن الميكانيزم الثاني توليد جذور الصيغة النشطة التي ترتبط بنصف البروتين (إثر تنشيط نصف الهيم منتجـا الـ ـ ROS (Pan وآخرون، 2002) كما هو الحال أثناء تثبيط الـcumenhydroperoxide من خـلال الارتبـاط بموقـع ببتيدي cys-436. ويعتمد الميكانزم التثبيطي الثالث للنظـام السـيتوكرومي علـى كـل مـن ألكلـة (alkylation) وأستلة (acylation) النصف البروتيني كما هو الحال مـع chloramphenicol وبعـض الهيدروكاربونات العطريـة العديـدة الحلقـات (Schuldt وآخـرون، 2004) حيـث يـتم تحويـل الـchloramphenicol سيتوكروميا إلى oxamyl chloride الذي يثبط الأنـزيم CYP2B1 مـن خـلال التثبيت مع بواقي الليسين البروتيني. كما يتم تحويل 2-englaphtaene عبرCYP2B1 وCYP2B4 إلـى ketene الذي يغير من المركز التثبيطي للببتيد بـglut-302 ويلعب هذا التركيز العـالي للمنـتج دورا تنشيطيا للأوكسجين (Usia وآخرون، 1991). وذهب Katachi وآخـرون (1988) إلـى أن المثـبط الوحيد قد يتدخل بعدة ميكانزمات للتثبيط، إذ وجد أن المركب 10-undocyonic acid يثـبط CYP2B1 عبر ألكلة الهيم، إلا أنه قد يثبط CYP4A1 عبر ألكلة البروتين. غيرأن تعدد آليات التثبيط للسـيتوكروم CYP450 يـؤدي إلـى نتـائج متغـايرة، فتثبـيط السـيتوكرومين CYP2C6 وCYP2C11 بواسطة:3,5dicarbethoxy-2,6dimethyl-n-ethyl 1-4 dehydropyridine يتم وفقا لآلية أيثلة الهيم (N-ethylation) (Amit وkristine ، 2006).

الخلاصة

يمكن للنظام الرودوكسي الميكروزومي المحرض أن يكون مصدرا لتسرب الـ ROS إثر تراكم أو إرتباط الأيضيات. إن تثبيط الـ CYP2E1 المحرض بـ INH وتثبيط CYP3A4 المحرض بـ RMP يعزز آليات الفعل الوقائي.

- حقق المستخلص البيتانولي لـ *C. fuscatum* عند 400mg/Kg تخفيضا لنشاط كل من PNP-H وAH مؤشرات نشاط CYP2E1 ، بينما عزز من نشاط الـ epoxide hydrolase.
- ثبط P7 عند (5-10 µM) ويماثله في هذا الأثر التثبيطي الـ فلافونول (8C3) إذ حقق فعلا تثبيطيا بدءا من 05 µM.
- تخصص الـ 11E بتثبيط CYP3A4 عند (5-25 µM) بينما حقق 8C3 فعلا تثبيطيا عند التركيز 25 µM.

6 الدور الوقائي لـ *C. fuscatum* و*H. cheirifolia* على الكريات الحمراء بالجرذان المعاملة *in vivo* بـ INH و RMP.

جدول (8.B): دورالمستخلص البيتانولي لكل من *C. fuscatum* و*H. cheirifolia in vivo* على مؤشرات الكريات الحمراء بالجرذان المعاملة بـ INH+RMP

المعاملات	الفترة **التجريبية** 7 **أيام**				الفترة **التجريبية 15** يوما			
	الشاهد	INH + RMP (A)	*C.fuscatum* + (A)	*H.cheirifolie* +(A)	**الشاهد**	INH+RMP (A)	C.*fuscatum* + (A)	H.*cheirifolia* +(A)
RBC(10^6/mm^3)	0,53±7,41	**0,65±6,14	0,8±6,09	*0,94±7,10	0,43±7,65	**0,78±5,54	0,50±6,10	**0,45±7,02
Hb(g/dL)	0,70±14,60	*0,63±13,80	14,2±70,30	*0,07±14,2	0,80±14,80	**1,98±9,98	*1,80±12,00	**0,68±13,90
HCT(%)	6,10±42,40	*4,20±35,6	4,80±38,60	*5,00±40,00	5,07±41,90	**3,90±28,80	*4,20±34,80	**5,03±41,80
MCV (FL)	3,20±57,80	*3,02±53,00	2,50±54,60	**3,4±57,50	4,10±58,20	**4,40±49,50	*2,80±54,00	**3,50±57,60
MCH (pg)	0.4 ±19.98	**0,20±17,90	0,30±17,80	*0,40±18,20	0,30±19,20	**0,15±17,02	*0,40±18,00	**0,30±19,00

RBC : كريات حمراء، Hb:هيموجلوبين، HCT: هيماتوكريت، MCV :متوسط الحجم الخلوي، MCH : متوسط الهيموجلوبين الخلوي.

n = 6 ± SD; P*<0.01; P**<0.001

جدول (10.B): الأثر التثبيطي للمركبات الفلافونويدية على أكسدة Ferrocytochrome Cالمحرض بـ $O^{\circ -}_{2}$

المركب	الشاهد	التركيز (µM)							
		7,5		15		30		SOD	
		a	b	a	b	a	b	a	b
isoquercitrin	1,8±13,4	**0.7± 4.1	**2,8±69	**0,9±9,6	9,3±28	*1,8±13,20	0,01±1	0,4±7,8	41
rutin	1,7±12,8	**0,7±4,2	**3,20±67	*0,80±12,04	1,8±5	*8,8±162	0,9±6	0,4±7,8	39
P73	1,3±13,2	**0,4±3,9	**5,8±70	*0,9±10,5	9,3±20	3,5±12,1	0,8±8	0,4±7,8	40
8C2	1,4±12,9	**0,2±5,8	*8,5±55	4,5±11,9	3,5±7	4,5±12	1,9±6	0,4±7,8	39

cytochrome C (nM/ml-RBC) المؤكسد : a ؛ النسبة التثبيطية : b؛ الشاهد : 0 µM

n = 6 ± SD; P*<0.01; P**<0.001

تدلي نتائج هذه الدراسة والمدونة بالجدول (8.B) بأن الجرذان المعرضة لـ INH و RMP قد صاحبها اختزال معتبر بدلائل الكريات الحمراء كما يشير إليه اختزال كل من الهيماتوكريت والمحتوي الهيموجلوبيني، والتركيز الهيموجلوبيني والحجم الخلوي المتوسط خاصة بالأسبوع الثاني من المعاملة. لقد أبدت هذه الكريات الحمراء ودلائلها استجابة معتبرة في حالة التعاطي المسبق لكل من *C. fuscatum* و*H. cheirifolia* وصاحب ذلك تحسن في مؤشرات الاجهاد التأكسدي، حيث تـوازت استجابة كل من الكاربونيل بروتين والـMDA (% 84-89) ووقت كلا النبتتين (% 62-95) الاختلالات الجلوتاتيونية (GSH ،GSH-px ، GST)على حين انفردت *H. cheirifolia* بتوقيـة الـ GR والـ G6PD (% 75-80) جدول (9.B). تدخّل كل مـن الـ rutin وisoquercitrin المعـزولان مـن *H. cheirifolia* في أسر $O^{\circ -}_{2}$ المولد *in vitro* بالكريات الحمراء المؤكسدة ذاتيا بما يكـافئ (69، 67 %) على التوالي عند جرعة إستجابية (7.5 µM) جدول (10.B)، بينما وجد بـأن المـركبين P73 و 8C2 المفصولين من *C. fuscatum* قد أبديا استجابة قدرها (70، 55%) على التوالي عند نفس التركيز.

المناقشة

يعتبر النظام الهيماتولوجي أحد أهم الأنظمة المستهدفة بالآثار الجانبية الناجمـة عـن التعـاطي الدوائي بمضادات السل: isoniazid وrifampicin، حيث يصاحب هذا النظام حالة أنيميا إنحلالية معبرا عنها بـ anisocytosis وpoikilocytosis كمؤشرات لـ sidiroplastic aneamia (Hyman، 1995) واختزال صفائحي أو ما يعرف بـ immune thrombocytopenie (Hasting وFranzblau، 1988). إن نتائج دراستنا تتفق مع ما ذهب إليه هؤلاء الباحثون حيث أدى تعاطي كل من الـ INH وRMP إلـى

ظهورمعالم الأنيميا الهيبوكرومية كما يعكسه انخفاض التركيز الهيموجلوبيني وانخفاض الهيماتوكريت وباقي دلائل الكريات الحمراء.

إنه من المعلوم جيدا بأن الـINH يمكنه أن يثبط pyridoxin phosphokinase والذي يتوقف عليه تركيز الفيتامين B6 (Hyman، 1995). وباعتبار أن هذا الفيتامين يتدخل كمرافق إنزيمـي ضـروري لنشاط N-amino levulinic synthetase المسؤول عن تخليق الهيم (Palma-Carlos ، 1974) فإن فقـده يعطل تخليق الهيموجلوبين منعكسا بحالة أنيميا هيبوكرومية (Storozuk وآخـرون، 1989). يكـون تراكم الطليعة الهيمية N-amino levulinic acid من جراء ما سبق مصدرا قويا للجذور الحرة (ROS). باعتبار أن الكريات الحمراء تعتبر محضنا مهما لمعدن الحديد فـإن نوعـا متميـزا مـن الفعاليـات الميتابوليزمية متوقع الحدوث، حيث أن عمليات الأكسدة الذاتية الواردة تكون مصدرا لـ O°_2 وفقـا لتفاعلات Haber-Weiss وFetong المنتجة لأقوى الجذور الحرة وهو الجذر الهيدروكسلي (OH°) (Bor وآخرون ، 2006).

ولقد أشير سابقا بان المضادات الحيوية من شأنها أن تفعل الكريات البيضاء لإنتاج O°_2 أو H_2O_2 لإدراك وظيفتها الخاصة بالقتل البكتيري(Hsin-Ling وآخرون، 2006). وهناك تأثيرمتـداخل بـين الكريات الحمراء والبيضاء حيث أشار (Misra وFridovich، 1972) إلى أن تنشيط تحريرالـ ROS بالمتعادلات ينعكس على الخلايا الطلائية والكريات الحمراء حيث يمكن أن يتغلغل إليهـا مفعـلا بهـا تفاعلات الـ Fenton كما سبق الذكر.

إن اختلال التوازن بين الأنظمة الخلوية المضادة للأكسدة في الكريات الحمراء على حـد سـواء وعوامل الإجهاد التأكسدي يمكن أن يحدث إختلالات مرفولوجية وفزيولولجية (Mariken وآخـرون، 2004) يترجم بفعاليات الاكسدة اللبيدية، حيث أن الجذر الهيدروكسيلي يـرتبط بسـرعة فائقـة مـع المركبات العضوية (Shakelford وآخرون، 2000). كما أن الـ $O^{\circ-}_2$ يرتبط بصـورة بيرودوكسـيل (HO°_2) والذي يتفاعل فورا مع الاحماض الدهنية غير المشبعة (Schuldt وآخرون، 2004)، حيـث أن الـO°_2 ذو قوة انتشارية معتبرة عبر غشاء الخلية إذ يعبر القنوات الغشائية بيسر(Stajner وآخرون، 2006) . يتوزع بغشاء الكريـات الحمـراء الطبيعيـة الفوسـفولبيدات ويكـون sphengomyelin و (PC)phosphatidyl choline أكثر سيادة بالطبقة الغشائية الخارجية بينما يتموقـع الـ phosphattidyl serine (PS) والـphosphatidylethanolamine (PE) بالطبقة الداخلية للغشـاء (Fridovich وLynch ، 1978). تكون هذه الفوسفولبيدات أكثر استهدافا بالجذور الحرة خاصة منها الـ (PE) لغناها بـ : C2 4 و 6 : C22 (Koster وSleei، 1983). إن هذه الفعاليات تكون مدعاة لحدوث الاكسدة اللبيدية التـي من شأنها أن تترجم في صورة إنحلال مؤديا إلى حالـة أنيميـا (Sato وآخـرون، 1995). ويمتـد أثرالأكسدة اللبيدية إلى إحداث اختلالات على المستوى البروتيني ينعكس باستنفاذ المجاميع الثيوليـة أو

بأكسدة الأحماض الأمينية مؤديا إلى ارتفاع معدلات الكاربونيل بروتين كما ظهر بدراسـتنا بالنسـبة للكريات الحمراء الخاصة بالجرذان المعاملة بالـ INH والـRMP. إن هذه التغيرات البروتينية بأغشية هذه الخلايا يصاحبها تغيرات على مستوى النفاذية والسيولة وأنتجينات الكريات الحمـراء (Carrell وآخرون، 1978).

قد يحدث ارتفاع تركيز الـ ROS خسائر معتبرة للجزيئات الضخمة خاصة منها الأنظمة المضادة للأكسدة (Sandra وآخرون، 2003) حيث أبدت نتائج هذه الدراسة بأن الأنظمة المضـادة للأكسـدة (CAT, SOD, GST, GSH) بالنسبة للكريات الحمراء المتحصل عليها من جرذان عوملـت بالـ INH والـRMP قد انخفضت معدلات نشاطها، وقد يكون مردها إلى الخلل الذي أصاب المجموع البروتيني من خلال الغزو الجذري أو نتيجة للتسرب البروتينـي عبـر الأغشـية المخربـة كمـا أدلاه (Chie وآخرون، 2004). وأشارت دراسات سابقة إلى أن (PAS, INH, RMP) مضادات سل أمكنهـا تثبـيط الـ G6PD بالمسـار البنتـوزي الفوسـفاتي ذي العلاقـة المباشـرة بتركيـز الـ GSH (Cotelle، 2001).

تدلي نتائج هذه الدراسة بأن الأنظمة الخلوية المضادة للأكسدة قد أبدت استجابة ملحوظـة أثنـاء المعالجة المسبقة بالمستخلص البيتانولي *H. cheirifolia* و*C. fuscatum* خاصة الـ SOD الذي يتكفـل باستبعاد الـ O°_2 والـCAT الذي يتخلص من H_2O_2 بمعدل (% 71-42) ، (% 78-54) وكـذا النظـام الجلوتاتيوني بشكل خاص(GST, GSH-px, GR, GSH) الذي عـدل بمعـدل (% 62-40)، (% 85-68) استجابة لفعل *C. fuscatum* و*H. cherifolia* على التوالي. وإلى جانب تحفيـز النظـام ، فإنـه سـجل إنخفاض في معدلات االأكسدة الليبدية الذي يعكسه انخفاض معدلات الـ MDA وكذا الأكسدة البروتينية والذي يعكسه تثبيط الكاربونيل بروتين، والذي سجل بـ 82، 84% بالكريات الحمراء علـى التـوالي بالنسبة للمستخلص البتانولي *C. fuscatum*. يفسر فعل هذين المستخلصين بوجود مركبات فعالة تحفز النشاط الأنزيمي لمضادات الأكسدة وترفع معدلات الثيول البروتيني، ولقد تداول هـذا كثيـرا لـدى الباحثين (Aroma وCuppett، 1997) والذين أشاروا إلى أن الفلافونيدات يمكن أن تتـدخل بإنهـاء التحلل الغشائي وإبطال الأكسدة الليبدية بفضـل chain-breaking antioxidant والـذي يـؤمن حفـظ البروتينات من الأكسدة (Bors، 1996؛ Pietta ، 2000). ودعم ذلك كل من (Bors وآخرون، 1996؛ Velazquez وآخرون، 2003) الذين وجدوا بأن مسـتقلابات الفلافونيـدات بإمكانهـا أن تفعـل دور الفيتامين E بأغشية الكريات الحمراء لصيانة الأحماض الدهنية غيـر المشـبعة (Cody و آخـرون، 1986) . ولقد أشار Marikan وآخرون (2004) بأن الفلافونيدات يمكن أن تسـلك المسـلك المضـاد للأكسدة وذلك بأسر الجذور الحرة الأكسيجينية أو بحماية النظام المضاد للأكسدة الدفاعي من الإختزال. إن تفسير ميكانيزم فعالية هذا المستخلص البيتانولي بالنسبة للدراسـات *in vivo* تتطلـب منـا فحـص المركبات المعزولة من *C. fuscatum* و مقارنتها بالمركبات المعزولـة مـن *H. cheirifolia* وذلـك

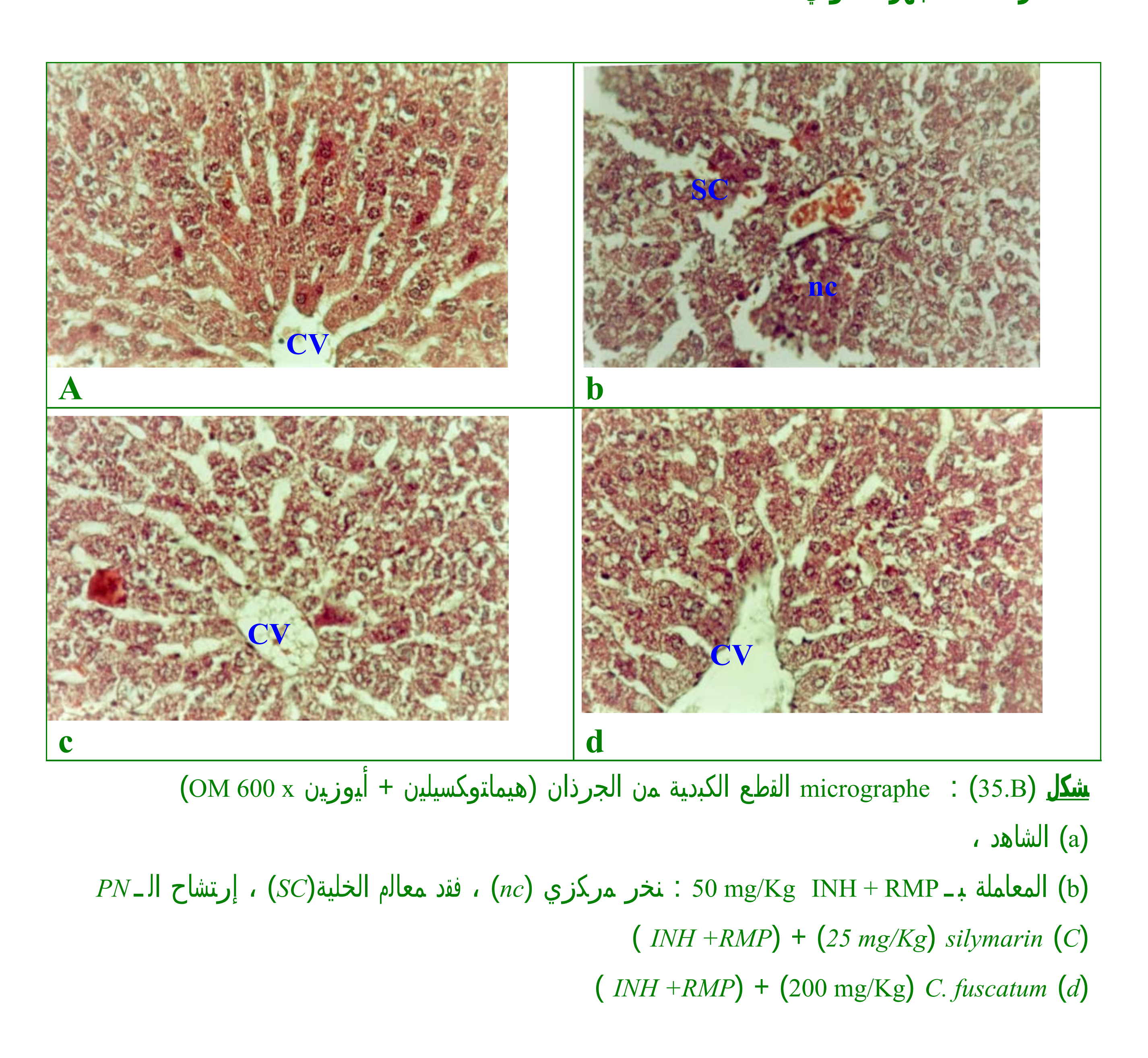
بإخضاعها للدراسات *in vitro* لتحديد الفعالية على المستوى الجزئي للمركبات النقية ولإختبار طبيعـة هذه الفعالية خاصة في دور الآسر للجذور المولدة *in vitro* بالأكسدة الذاتية للكريات الحمراء. وتبين لنا أنّ مشتقات luteolin وapigening التي تم عزلها من *C. fuscatum* قد أبـدت دورا تثبيطيـا قـدره 50 و77% للجذر $O_2^{°-}$ مقارنة بالـ rutin وisoquercitring الذي انحصر تأثيرهما بين(% 69-67)عنـدما اختبرت على تركيز7.5 µM.

الخلاصة

إستجاب النظام الهيماتولوجي الذي أظهر حالة أنيميا هيبوكرومية إثر التعرض *in vivo* للـ INH وRMP للفعل الوقائي لـ *C. fuscatum* عند 200 mg/Kg وذلك بتحريض النظام الرودوكسي الدفاعي بالـ RBc وبتراجع كل من الـ LPO وcarbonyl prteing . كما حقق المركبان P7 و8C2 فعالية معتبرة في أسر جذر الـ $O_2^{°-}$ المولّدة ذاتيا أثر أكسدة الـ RBc عند جرعة إستجابية 7.5 µM وهي بذلك تماثل دور كل من الـ rutin و الـ isoquercitrin

7. الدراسات النسيجية

1.7 دراسات المجهر الضوئي



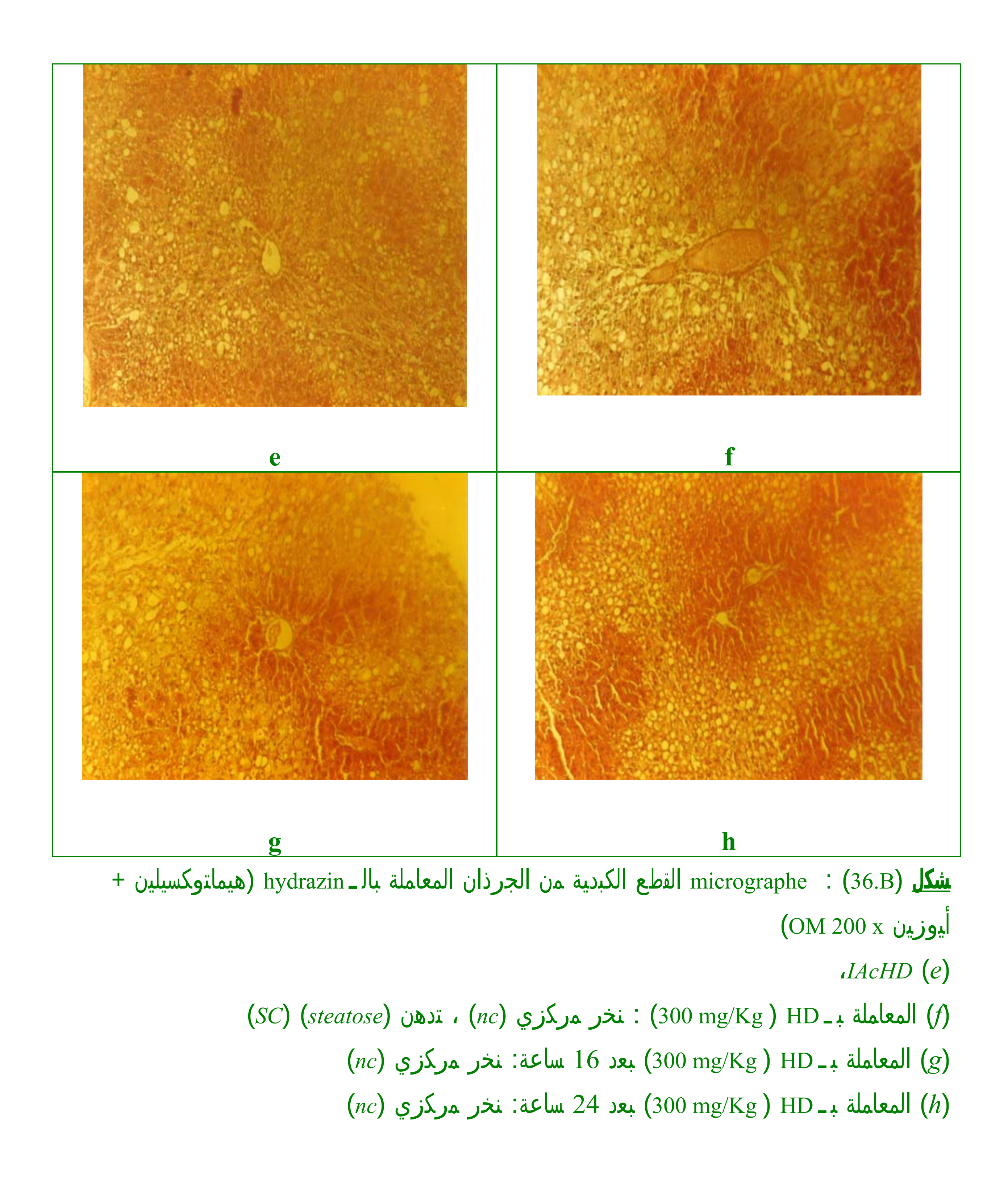
شكل (35.B) : micrographe القطع الكبدية من الجرذان (هيماتوكسيلين + أيوزين OM 600 x)

(a) الشاهد ،

(b) المعاملة بـ INH + RMP 50 mg/Kg : نخر مركزي (*nc*) ، فقد معالم الخلية(*SC*) ، إرتشاح الـ *PN*

(*C*) *silymarin* (*25 mg/Kg*) + (*INH +RMP*)

(*d*) *C. fuscatum* (200 mg/Kg) + (*INH +RMP*)



شكل (36.B) : micrographe القطع الكبدية من الجرذان المعاملة بالـ hydrazin (هيماتوكسيلين + أيوزين OM 200 x)

(*e*) *IAcHD*،

(*f*) المعاملة بـ HD (300 mg/Kg) : نخر مركزي (*nc*) ، تدهن (*steatose*) (*SC*)

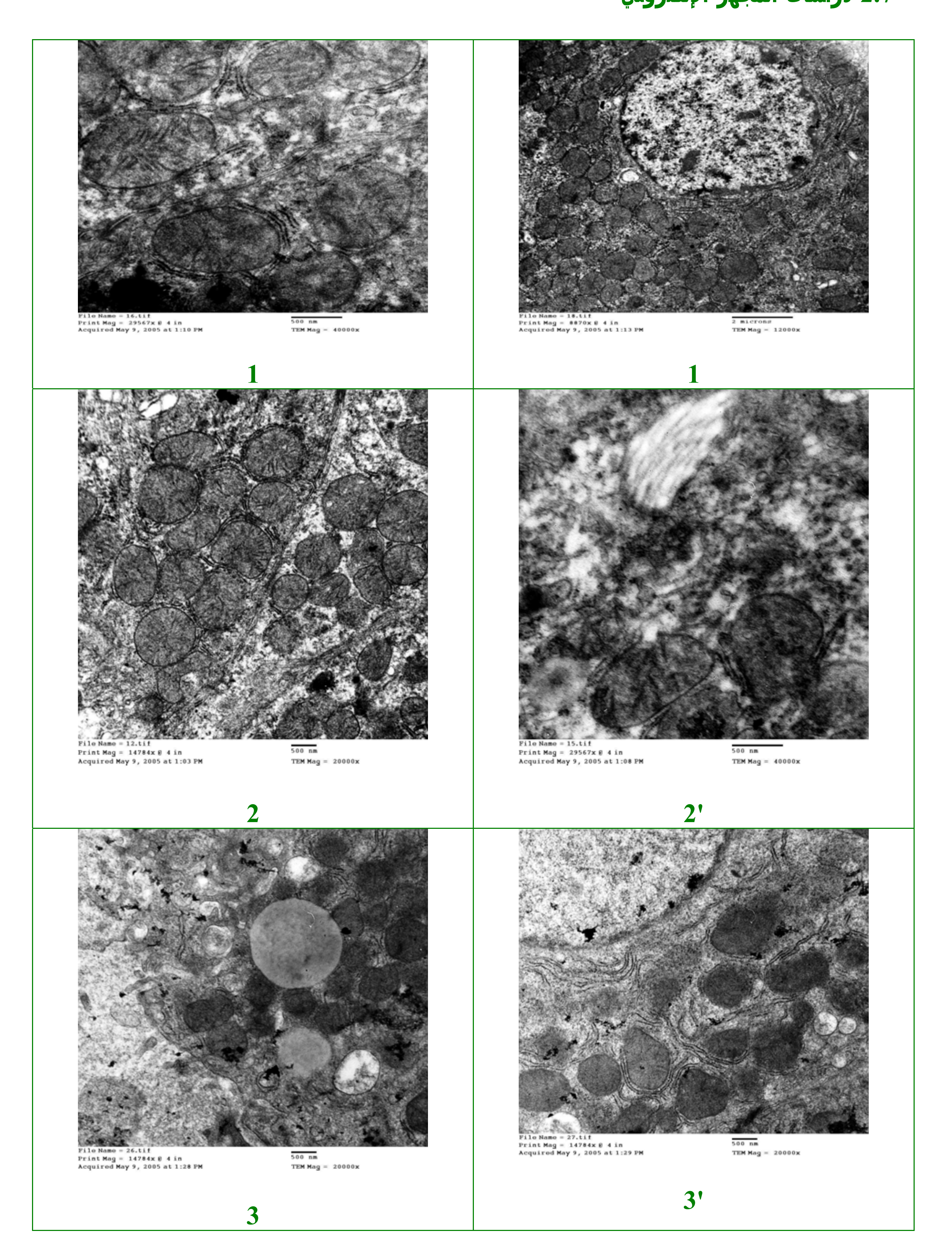
(*g*) المعاملة بـ HD (300 mg/Kg) بعد 16 ساعة: نخر مركزي (*nc*)

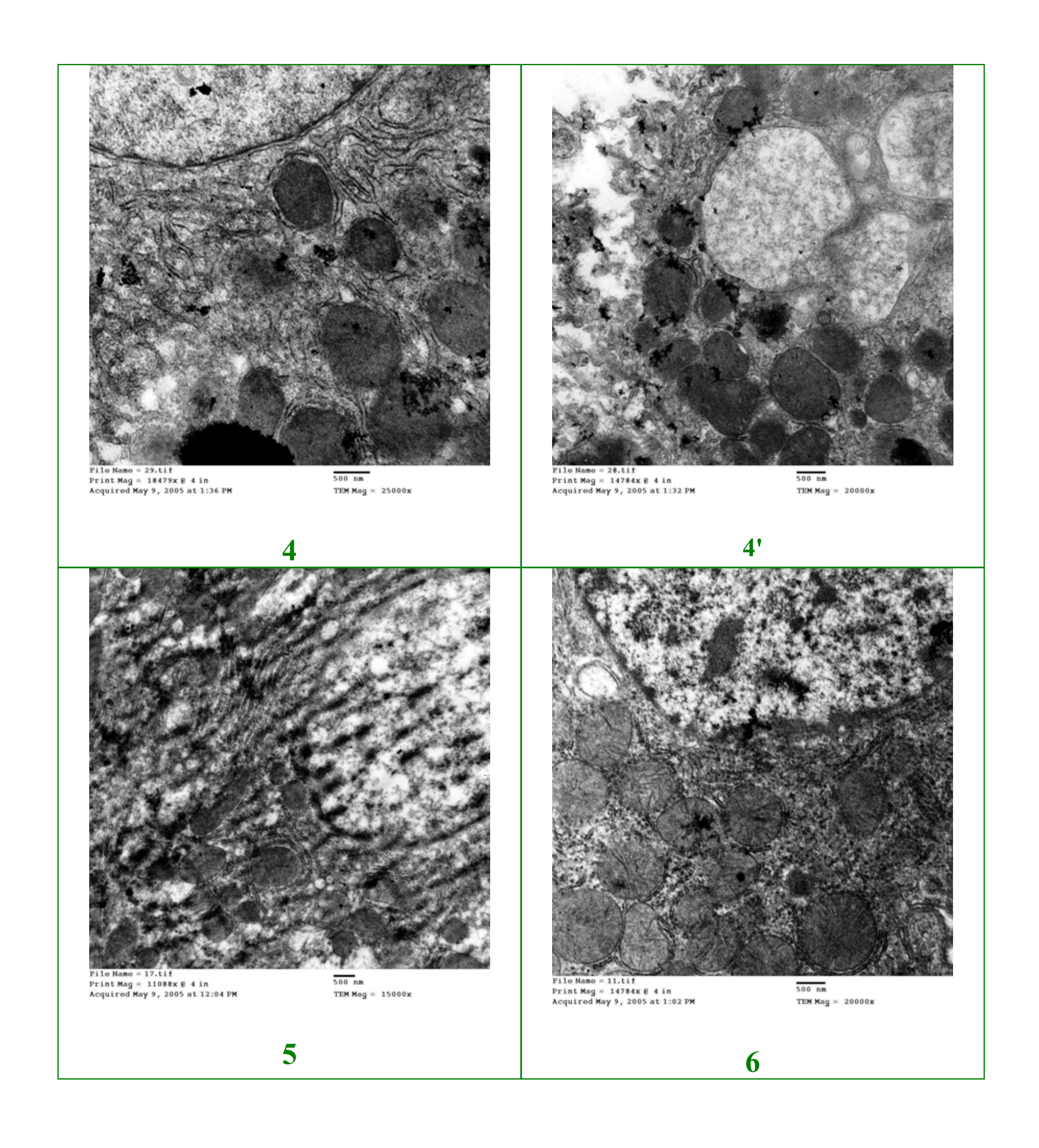
(*h*) المعاملة بـ HD (300 mg/Kg) بعد 24 ساعة: نخر مركزي (*nc*)

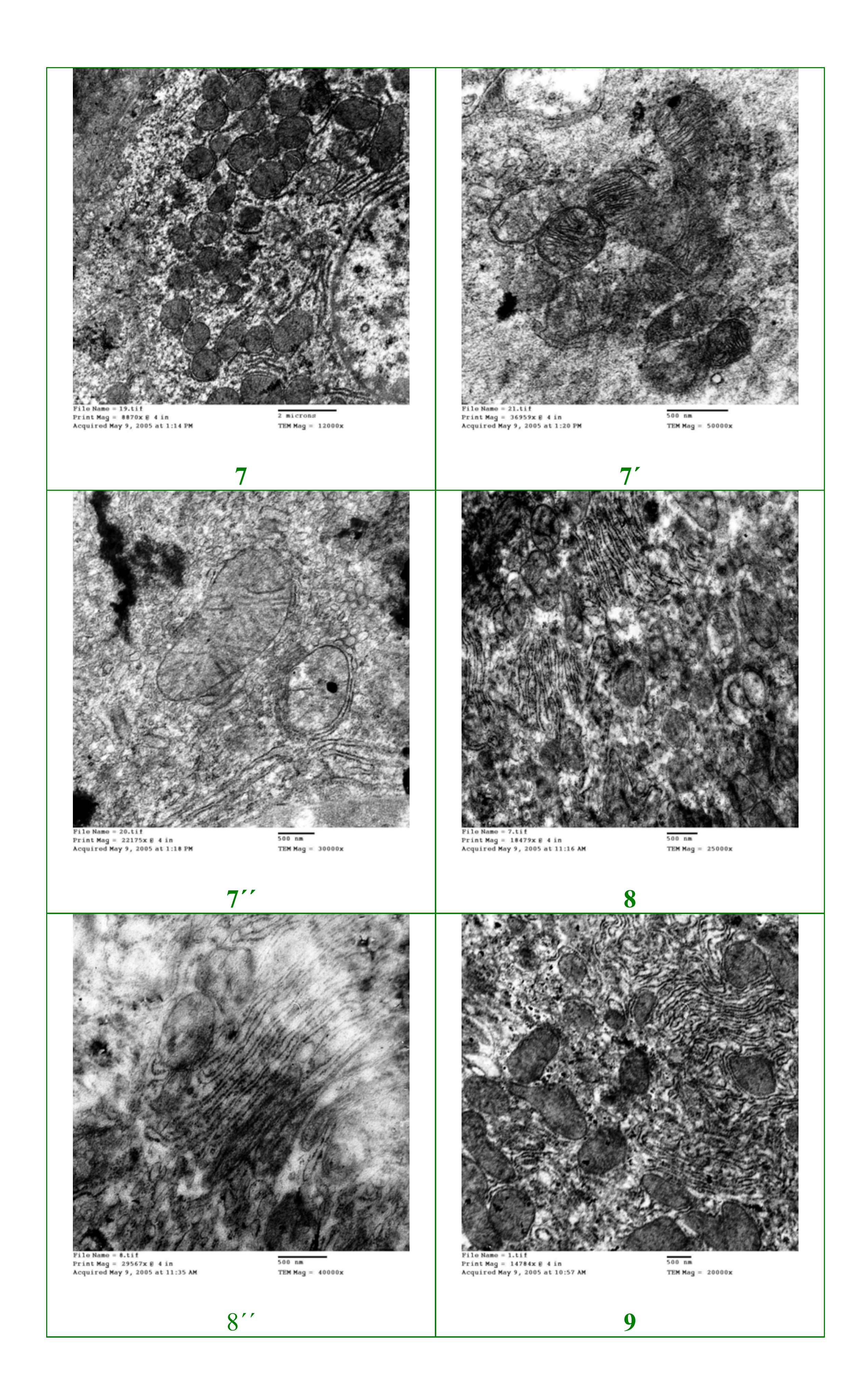
تبدي نتائج دراسات المجهر الضوئي بأن عينات الشاهد يظهر بها الخلايا سليمة ومحددة المعـالم (شكل 35.B، a) على حين يبدي الشكل (35.B ،b) بان الـ INH وRMP تسـبب فـي فـرط التنخـر المركزي (الوريد المركزي بالكبد)، تمدد الوريد البابي، إنتفاخ خلـوي، إرتشـاح الخلايـا الإلتهابيـة وفجوات حول الوريد البابي. بينما تبدي نتائج الشـكل (35.B ،c وdg) أن كـلا مـن silymarin و *C. fuscatum* قد حدت من تطور هذه الحالة إذ ظهرت مواطن التجدد الخلوي ومنعت هذه الخلايـا مـن الوصول إلى حالة النخر.

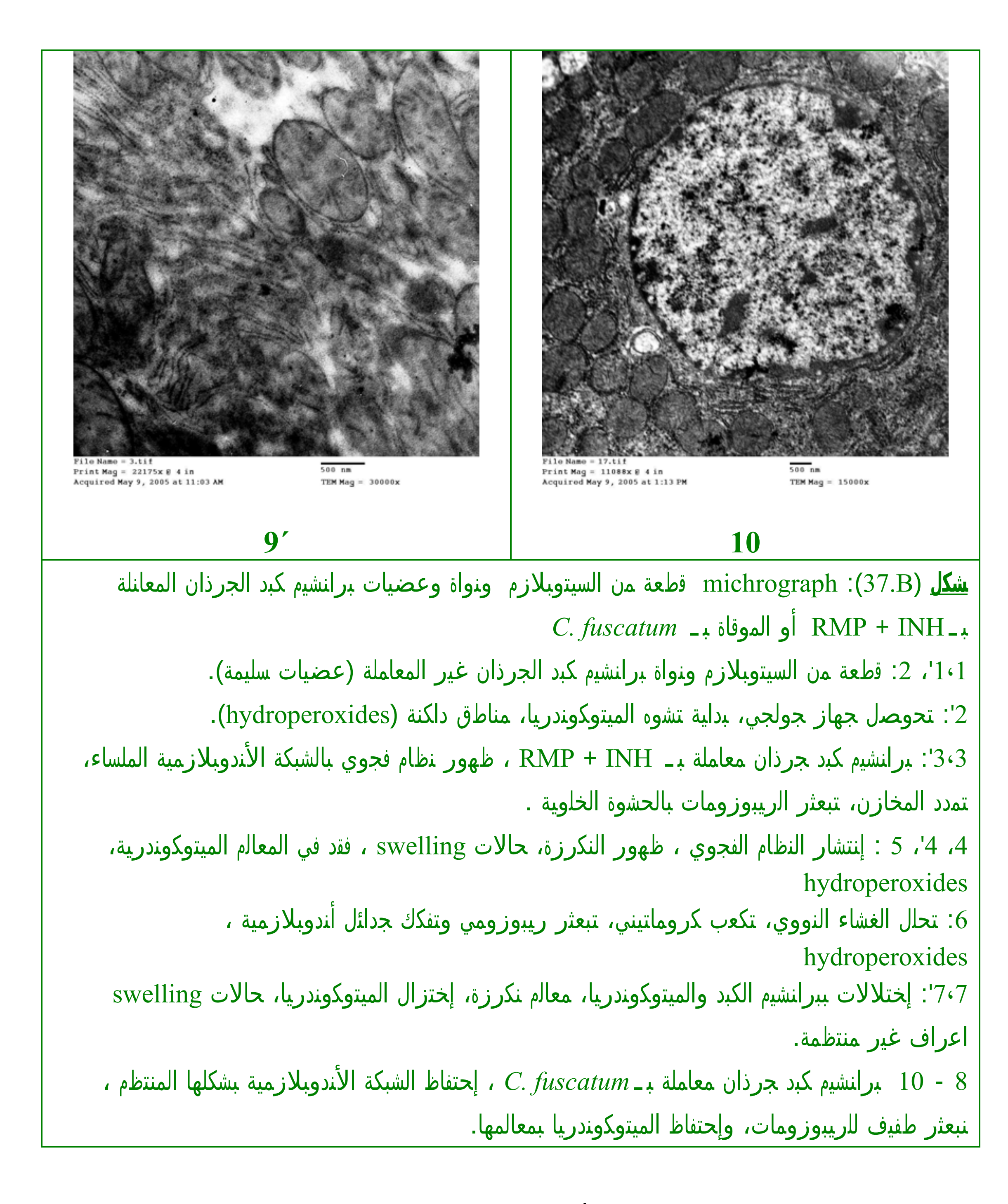
وتبدي نتائج دراسة الجرذان المعاملة بجرعة منفردة من الــ HD أو AcHD لمـدة 24 سـاعة بأكباد الجرذان المعاملة بـ mg/Kg 300 بالـHD مظاهر نكرزة واضحة لم تظهـر بـنفس المسـتوى بالأكباد المعاملة بنفس الجرعة من AcHD شكل (*36.B*، e وfg). كما يبدي الشكل (36.B g) بأن أكباد الجرزان المعرضة لـ mg/Kg 300 من الـHD قد ظهر بها إرتشاح دهني في صورة فجوات دهنيـة ضخمة macrovesicolor degeneration steatose بعد 16 ساعة من المعاملة ليقل هذا التراكم الـدهني بعد 24 ساعة وتظهر بؤر نخر مركزي (شكل36.B h).

2.7 دراسات المجهر الإلكتروني




File Name = 29.tif
Print Mag = 18479x @ 4 in
Acquired May 9, 2005 at 1:36 PM
500 nm
TEM Mag = 25000x
4
File Name = 28.tif
Print Mag = 14784x @ 4 in
Acquired May 9, 2005 at 1:32 PM
500 nm
TEM Mag = 20000x
4'
File Name = 17.tif
Print Mag = 11088x @ 4 in
Acquired May 9, 2005 at 12:04 PM
500 nm
TEM Mag = 15000x
5
File Name = 11.tif
Print Mag = 14784x @ 4 in
Acquired May 9, 2005 at 1:02 PM
500 nm
TEM Mag = 20000x
6


File Name = 19.tif
Print Mag = 8870x @ 4 in
Acquired May 9, 2005 at 1:14 PM
2 microns
TEM Mag = 12000x
7
File Name = 21.tif
Print Mag = 36959x @ 4 in
Acquired May 9, 2005 at 1:20 PM
500 nm
TEM Mag = 50000x
7′
File Name = 20.tif
Print Mag = 22175x @ 4 in
Acquired May 9, 2005 at 1:18 PM
500 nm
TEM Mag = 30000x
7′′
File Name = 7.tif
Print Mag = 18479x @ 4 in
Acquired May 9, 2005 at 11:16 AM
500 nm
TEM Mag = 25000x
8
File Name = 8.tif
Print Mag = 29567x @ 4 in
Acquired May 9, 2005 at 11:35 AM
500 nm
TEM Mag = 40000x
8′′
File Name = 1.tif
Print Mag = 14784x @ 4 in
Acquired May 9, 2005 at 10:57 AM
500 nm
TEM Mag = 20000x
9



شكل (37.B): michrograph قطعة من السيتوبلازم ونواة وعضيات برانشيم كبد الجرذان المعاملة بـ RMP + INH أو الموقاة بـ *C. fuscatum*

1،1′، 2: قطعة من السيتوبلازم ونواة برانشيم كبد الجرذان غير المعاملة (عضيات سليمة).

2′: تحوصل جهاز جولجي، بداية تشوه الميتوكوندريا، مناطق داكنة (hydroperoxides).

3،3′: برانشيم كبد جرذان معاملة بـ RMP + INH ، ظهور نظام فجوي بالشبكة الأندوبلازمية الملساء، تمدد المخازن، تبعثر الريبوزومات بالحشوة الخلاوية .

4، 4′، 5 : إنتشار النظام الفجوي ، ظهور النكرزة، حالات swelling ، فقد في المعالم الميتوكوندرية، hydroperoxides

6: تحلل الغشاء النووي، تكعب كروماتيني، تبعثر ريبوزومي وتفكك جدائل أندوبلازمية ، hydroperoxides

7،7′: إختلالات ببرانشيم الكبد والميتوكوندريا، معالم نكرزة، إختزال الميتوكوندريا، حالات swelling اعراف غير منتظمة.

8 - 10 برانشيم كبد جرذان معاملة بـ *C. fuscatum* ، إحتفاظ الشبكة الأندوبلازمية بشكلها المنتظم ، نبعثر طفيف للريبوزومات، وإحتفاظ الميتوكوندريا بمعالمها.

تظهر نتائج الشكل (1، 1′، 2) بأن الـ ergoplasme لدى الجرذان غيـر المعاملـة بالـ INH وRMP أو الهيدرازين ذات مظهر متوازي منتظم مرده التوزيع المنتظم للإنتشار الريبـوزي للشـبكة الأندوبلازمية المحببة (شكل1). يفقد هذا الـ ergoplasme إنتظامه لـدى أكبـاد الجـرذان المعاملـة بالـ INH وRMP تتشتت الجدائل الريبوزومية بالحشوة الخلاوية (شكل2′). يتحوصل جهـاز جـولجي ويأخذ مظهرا عنقوديا وتظهر حويصلات واضحة ضمن الشبكة الأندوبلازميـة الملسـاء (شـكل2′). تنعكس أيضا سمية الـ INH أو أحد مستقبلاته مثل الهيـدرازين بـإختزال علـى مسـتوى العشـائر الميتوكوندرية عددا وتغيرات بنيوية وتأخذ المظهر الممتلـيء(حالـة swelling) (شـكل7) وتتطـاول

أعرافها ولا تكون منتظمة، ويظهر إستمرار الثنائية الغشائية مع الغلاف الميتوكوندري كما يسـتعرض الغشاء على إمتداد أطراف الغلاف الميتوكوندري وأختزال بالمناطق الكثيفـة وإنعمـاد سـيتوبلازمي (شكل7'). يصاحب عينات أكباد الجرذان المعاملة بالـINH تحال غشائي نووي وتجـزء الكرومـاتين بشكل مكعبات تلتصق بالغلاف (شكل6) وإنتشار النظام الفجوي بالشبكة الأندوبلازمية وظهور مواطن الـhydroperoxides التي تدل عليها البقع الداكنة(شكل 6). بينما يظهـر الشـكل (8-10) أن أكبـاد الجرذان المعاملة بـ *C. fuscatum* لازالت تحتفظ بالشكل المتـوازي للجـدائل الريبوزوزميـة وكـذا بالمعالم الميتوكوندرية بالرغم من رصد بعض من مواطن الـhydroperoxides .

المناقشة

إن الدراسات النسيجية تجسد مدى إستجابة الخلية الكبدية عند تعرضها للـ INH والـ RMP أو إلى المستقلب HD. ويبدو هذا بإختلالات هيموستازية تنعكس وظيفيا وبنيويا وتتطور زمنيـا لتكـون عكوسة لغاية حدود الإحتمال الفيزيولوجي. فقد بينت دراسات المجهر الضـوئي أن أكبـاد الجـرذان المعاملة بـ الـINH وRMP أوالـHD تعاني من غياب المعالم الهندسـية للخليـة الكبديـة ومظهـر التحوصل وإنتشار الفجوات والنخر المركزي البؤري ويترجم هذا بتسرب كل من ALT وAST دلالـة على التمزق الغشائي وكذا تسرب الـLDH كمؤشر على فقد حيوية الحلية و تسرب الـSDH كمؤشر على العطب الميتوكوندري. فالأثر السام للجذور الألكيلية على الأغشية الخلويـة وأغشـية العضـيات وأختلال تفاعلات الميثلة قد يرتبط مباشرة بعطب القنوات الكالسيومية (Kanco وأخـروون، 1984). كما أن تفاعلات الألكلة بالأغشية الحيوية تسبب حالة haloalkylation وفرط تشكل القطيرات الدهنيـة من جهاز جولجي فينجم عنها إرتشاحا دهنيا (Beron وأخروون، 1998). تعكـس سـمية الـ INH والـHD أيضا أختزال العشائر الميتوكوندرية فينعكس هذا بإنخفـاض معـدلات التـنفس ، الأكسـدة الفوسفورية ، قلة الـATP ، وتراكم الـADP والـAMP وتنافذ الصوديوم والكالسـيوم ، واسـتنفاد البوتاسيوم والمغنيزيوم وإظطراب حركات الماء والأيونات(Francis وأخروون، 2006).

يحرض كل من الـHD والـAcHD التعبير الجيني الخاص بالنظام CYP450 إذ يزامن الـ *CYPzel* تحولات الـHD وحالات النكرزة التي تتطور بمرور الوقت (Victoria وأخروون، 2004). ويـرتبط هذا بتنظيم جينات *CYP51* و *Mrd* و*Pckc9* التي تحكم تخليق الكوليسترول فتختل بهذا الأغشية الغنية بالكوليسترول (Jenner وTimbrell، 1994). لا تلبث الأحماض الدهنية أن تؤكسـد لتشـكل أجسـاما كيتونية تصدر خارج كبديا، وتؤستر الجليسريدات الثلاثية بالتناوب لتخزن أو تفرز في صورة VLDL (Prerce وأخروون، 1992).إن العطب الشديد لإنزيمات β-oxidation إثر التثبـيط الفـوري للتـنفس الميتوكوندري يسمح بتراكم الأحماض الدهنية غير المؤسترة فـي صـورة تـدهن (Raja وأخـرون، 2007)، كما أن الفتح المسامي وزوال الإستقطاب الغشائي وحـالات الـ swelling تسـبب تحـرر

السيتوكرومC المنشط للـ caspase السيتوزولي المسؤول عن المـوت المبـرمج. ويعرقـل عطـب الإنزيمات الغشائية ايضا بروتينات الـ calreticulin و Q5 وQ2 حيث أن ظهور الجسورثنائية الكبريت ما بين جزيئات الأكتين يخلّ بالشبكة الخطية تحت الغشاء البلازمي المحدد للهيكـل الغشـائي ينتهـي بالموت الخلوي (necrose) (Hussain وFrazia، 2002).


خاتمة واستنتاج

خاتمة وإستنتاج

لقد أنصب الإهتمام بهذه الدراسة على نبتتين صحراويتين هما *Chrysanthemum fuscatum* و*Colocynthis vulgaris* لإعتبارهما من أهم النباتات الصحراوية حيث وقع الإختيار على *C. fuscatum* من إحدى ضيات توقورت ضمن مخطط التنقيب وإجراء مسح نباتي للنباتات الطبية الصحراوية ضمن مشروع أبحاث الصحراء: "مركز التقنيات والأبحاث العلمية بالمناطق الجافة (CRSTRA).

أستبعدت *C. vulgaris* وبالأحرى الطور البيتانولي من الدراسة لعدم إستجابتها للفعالية البيولوجية المناطة بهذه الدراسة حسب ما أدلته الإختبارات البيولوجية، بينما أخضعت *C. fuscatum* خاصة الطور البيتانولي إلى الدراسة التحليلية لما أبداه هذا المستخلص من فعالية بيولوجية بإختبارات *in vitro* و *in vivo*.

ولقد بينت الفحوص التحليلية التمهيدية مدى غنى المستخلاص البيتانولي لـ *C. fuscatum* بالفلافونيدات حسب ما عكسته الخريطة الفلافونيدية، وأدى الفحص الكروماتوغرافي لـ 12.5غرام من المستخلاص البيتانولي بإستعمال الأميد كطور ثابت عبر الجمل 4/3/3 ، 13/3/3/1 ، 18/1/1 إلى كسور عدة تم تجميعها ثم الإنتقاء منها للكسور F2 ، F8 ، F11 و التي مررت بدورها بسلسلة من عمليات الفصل بإستعمال (ك، ط، ر) التحضيرية من متعدد الأميد إعتمدت على أنظمة مختلفة مع إستدعاء أحيانا للتنقية عمود الـSephadex. وقد تم الإعتماد في تعريف البنى الكيميائية للمركبات على أساس السلوك الكروماتوغرافي ومطيافية الأشعة UV ومطيافية ^{1}H NMR و^{13}C MNR و مطيافية الكتلة وتجاري الـHMBC. وقد أسفرت هذه الدراسة عن 17 مركبا ضاع منها بعض المركبات أثر التمرير على عمود الـ sephadex وعرف بنيويا 5 مركبات بينما حددت عائلات بعض المركبات لينتمي أحدها إلى عائلة الـisoflavone ومنه ما ينتمي إلى عائلة الـفلافونول وهي بينما ينتمي إلى عائلة الفلافون 4 مركبات.

إن أول مسارات إستقلاب الـINH هو فعاليات الأستلة عبر أنزيم N-acetyl transferase. وفي وجود الـcoenzyme A يمكن لكل من INH وacetyl-INH أن يحلمه في وجود amidohydrolase او الـamidase منتجا الـHD. ينجم إثر تدخل الـNAT وبعد أستلة ثانية HD diacetyl وتولد الجذور الحرة إثر تفاعلات الأكسدة عبر النظام CYP/FMO.إن الإرتباط التساهمي للمستقلبات النشطة HD أو AcHD بالجرعات العالية ينعكس بحالات أريلة للبروتينات السيتوزولية وبرتينات العضيات

الميتوكوندرية والشبكة الأندوبلازمية ، كما يخلّ تسرب الـ ـ ROS بالأنظمـة الرودوكسـية لمختلـف العضيات مستنفذا العتاد الدفاعي لكل من الـ hepatocyte والـ erythrocyte .

إن الجدلية القائمة حول آليات سمية الـ INH عبر أيضياته (HD وAcHD) أستدعت منا إخضاع جرذان لجرعة منفردة لكل منهما (300 mg/Kg). وقد رجحت هذه الدراسة بأن الـ HD أبلغ في التأثير وفقا لما عكسته معدلات ناقلات الأمين وحالات التدهن والنخر المركزي.

أدلت الدراسة الحالية والتي أستحدثت فيها السمية بالـ INH والـ RMP (50 mg/Kg) بـأن هـذه الجرذان قد أستنفذ بها النظام الدفاعي المضاد للأكسدة وأختزل بها النظام الإبيكينـولي الميكروزومـي والميتوكوندري. ولقد مكّن المستخلص البيتانولي *C. fuscatum* من تعديل وحفظ هذا النظام بكـل مـن الميتوكوندريا والمجنس الكبدي عند الجرعة 200 mg/Kg. أعتبرت صيانة النظام الجلوتـاتيوني GSH وGSH-px ونظام الـ ubiquinol كأهم الآليات الوقائية.

إن المستخلص البيتانولي الذي حقق صيانة للنظام الدفاعي *in vivo* سمح بإخضاع هذه النبتة إلى تحاليل كيميائية بغية التنقيب عن الجزيئات الفلافونيدية الفعالة لردع سمية كل من الـ INH والـ HD. ولتحديد آليات الفعل الوقائي بهذه المركبات تم إخضاعها للإختبارات *in vitro*.

تساهم الدورات الرودوكسية عبر المسارات السيتوكرومية وفعاليات التنفس الخاوي في إنتاج H_2O_2 المنتج بدوره لجذر الـ OH° عبر تفاعلات Fenton وHarber Weiss. إن تنوع مصادر الجذور يقتضي تنوع آليات الفعل الوقائي وبذا أخضعت المركبات الفلافونيدية المحددة الهوية إلى إختبارات الفعل المانع للأكسدة كإختبار وDPPH° وdeoxyribose واللمعانية والنشاط المخلبي للمعادن وإختبارات الفعل التثبيطي للاكسدة الليبيدية والتي أفادت بإمكانية تدخل كل: 8C2 و114 في أسر الجذور O^{2-} وكذا الـ DPPH مقارنة بالـ isoquercitrin. بينما تصدر 8C3 أسر الجذرOH° وحقق فعلا مخلبا للحديد مقارنة بالـ rutin وkaempferol ويمكنه أن يتحول إلى pro-oxidant بالتراكيز العالية. وقد أبدى كل منP7 و الـ 11E فعلا مخلبا قويا. أبدت الفلافونولات 8D1 وisoquerceting فعلا تثبيطيا لـ LPO المولد بـ CCl_4/NADPH وأستجابت الفلافوناتF11 وE43 لذات النظام بينما أستجاب كل من الـ isoflavone (113) و Kaempferol إلى النظام Fe^{2+}ascorbate.

يتضح من الفحص البنيوي أن هذه المركبات تتمتع بالروابط C-3 وC-2 والوظيفة 4-oxo، ويدعم هذا الرأي أن الحضور الحلقي غير المشبع يسهل حركة الإلكترون، كما تعتبر الحلقة B

عاملا محددا للأسر الجذري وأن كاتيكول الحلقة B و 3-OH و4-oxo بالحلقة C و5-OH تشكل مجالا قويا للمخلبة، وقد وجد أن هذا ذوعلاقة مباشرة بالرابطة γ .
كما أن المركب8C3 الذي يمكن أن يتحول إلى طليعة مؤكسدة ترتفع قدرته الرودوكسية بالتراكيز العالية إثر التداخل مع السلاسل التنفسية في حضور الحديد.

أخضعت المركبات المعزولة من *C. fuscatum* والتي أبدت فعلا آسرا لكل من OH° ، O^{2-} ، DPPH° إلى الإختبارات *in vitro* بالمزارع الخلوية عوملت من خلالها عزلات كبدية بـ 100 µM من الـ hydrazin وقد حققت المشتقات الليتيولينية 8C2 (عند 20 µM) و114 (عند 10 µM) تراجعا في تسرب كل من الـ LDH وSDH بالوسط المزرعي مما يعكس صيانة الغشاء البلازمي وردع الأكسدة اللبيدية والذي يتم بأحد آليات الأسر الجذري المختبرة سابقا *in vitro*. ويصون أن كل من المركبين 8C2 و114 الـ GSH من الإستنفاذ ويدعم كل منهما نشاط كل من الـ GST والـ GR بالعزلات الكبدية.
تظهر الدراسات *in vitro* و*in vivo* أن صيانة النظام الجلوتاتيوني والأغشية البلازمية بالـ hepatocyte والميتوكوندريا يكون مرده إلى غنى المستخلص البيتانولي بالفلافونيدات.

لمزيد من تفهم آليات الفعل الواقي إرتأت هذه الدراسة التغلغل علي مستوى الأنظمة الرودوكسية للعضيات مثل الميتوكوندريا والنشاط الميكروزومي لتحديد بعض الآليات التي ترتبط مباشرة مع وقاية العضيات من الإستهداف الجذري وتراكم الـ LPO واختلال الأنظمة الرودوكسية.
اختبر كل من8C2 ، apigenin ، kaempferol لتحديد التداخل الجزيئي بينها وبين النشاط التنفسي الميتوكوندري. إن تفاقم الـ ROS على مستوي السلاسل التنفسية يعطل نشاط أنزيمات المعقدات التنفسية عبر إزالة مراكز الحديد الكبريتية، كما أن إستنفاذ الـ ATP وزيادة التدفق الكالسيومي السيتوزولي ينعكس بالموت الخلوي. وتؤثر حالة رودوكس الثيولات والنيكليوتيدات على طاقة الإقتران بصورة مباشرة عبر الثغور النفوذة. لقد عكست الدراسة الحالية مدى إختزال الـ RC بالتراكيز المرتفعة (0.01-0.1 mM) وقد يعود مرد ذلك إلى تثبيط الأكسدة الفوسفورية (الطور4) وتسريع الطور3 .ولم تبد الفلافونيدات المدروسة أثرا يذكرعلى المعقدات I وIV وكذا على الجهد الغشائي الميتوكوندري إلاّ أنها ثبطت الـ LPO وتوليد الـ $O_2°$- . ويتفق هذا مع نتائج إختبارات فعل الأسر الجذري بالوسط اللاحيوي. وتخلص هذه الدراسة إلى أن كلا 8C2 ، apigenin ، kaempferol تتدخل وقائيا عبر آلية الأسر الجذري بالميتوكوندريا. ويحذر من التركيز العالي الذي ينجم عنه الموت المبرمج. يظهر أن الهيكل البنيوي ينعكس على هذه التأثيرات حيث تتوقف الوظيفة اللاإقترانية على طبيعة ومواقع المستبدلات إذ تتحكم في آليات تحول الـ H^+

بالغشاء الميتوكوندري الداخلي؛ ووجد أن الـkaempferol يؤثر إنتقائيا على FP I . مما سبق يمكن القول أن تدخل الفلافونيدات في منع تسرب الـROS من معقدات السلاسل التنفسية يشكّل أحد الميكانيزمات الوقائية، ولاتهمل التراكيز العالية إذ يمكن أن تستغل في فعاليات القتل الخلوي و الدور المضاد للطفور والأورام.

اهتمت هذه الدراسة أيضا بإختبار الأثر الوقائي للمستخلص البيتانولي لـ*C. fuscatum* وكذا المركبات الفلافونيدية على الجهد الرودوكسي بالنظام الميكروزومي كأحد الآليات المعززة للنظام المضاد للأكسدة. إن تحريض النظام السيتوكرومي بفعل الـxenobiotics أو بعض الايضيات يكون مدعاة لتحرر الـROS . وبإعتبار أن الـINH يكون محرضا للـCYP2E1 والـRMP محرض نوعي للـCYP3A4 فقد أعتمد التثبيط السيتوكرومي كإحدى آليات الفعل الوقائي إنطلاقا من تقدير نشاط كل من AH وPPN-H وERMD . وبينت هذه الدراسة أن الفعل التثبيطي للمستخلص البيتانولي تحقق عند 400 mg/Kg مقارنة مع الأثر المباشر لصيانة النظام الرودوكسي (200 mg/Kg) . وقد أغرانا هذا بدراسة التداخل البنيوي الوظيفي لكل من P7 و 11E وتبين P7 و8C3 يثبطان نوعيا CYP2E1، على حين أستجاب11E لتثبيط CYP3A4. يحكم الحث أو التثبيط السيتوكرومي كل من التركيز وطريقة التعاطي، كما أن الميثلة تعزز هذا الفعل. إلاّ أن المركبات عديدات الهيدروكسيل تكون أقل فعالية مقارنة بالفلافونات. ووجد بأن المجاميع الهيدروكسيلية بالموقع ´C-3 و´C-4 يختزل كثيرا الفعل التثبيطي بينما تعززه الرابطة C-2 و C-3 بالحلقة C إذ تعتبر محددات إنتقائية يمكن أن تيسر التداخل بين NADH CYP450 و CYP oxidoreductase.

لم يعف النظام الهيماتولوجي وأنظمته الرودوكسية من إستهداف تـأثير كـل مـن INH و RMP منعكسا في حالة أنيميا هيبوكرومية. وقد أستجابت هذه الأنظمة للمستخلص البتانولي عند 200 mg/Kg بإحداث تراجع في هيموغرام الأنيميا وتحريض النظام الرودوكسي بالـRBc، وأبـدت الجزيئـات P7 ومشتق 8C2 فعلا آسرا للجذر $O_2^{\circ-}$ عند جرعة إستجابية (7.5 µM) مقاربـة لفعـل كـل مـن rutin وisoquercitrin.

تستجيب الخلية الكبدية المعرضة للـ INH والـــRMP أو إلـى المسـتقلب HD بـإختلالات هيموستازية تنعكس وظيفيا وبنيويا. وتتطور هذه الإختلالات زمنيا لتكـون عكوسـة لغايـة حـدود الإحتمال الفيزيولوجي. وتكملة لما أدلت به التغيرات البيوكيميائية المصاحبة لحالة السـمية والإجهـاد التأكسدي وإختلال الأنظمة الرودوكسية فإن الدراسات النسيجية بدورها تجسد هـذا حيـث أوضـحت دراسات المجهر الضوئي أن أكباد الجرذان المعاملة بـ الـINH وRMP أو بالهيدرازين تعـاني مـن غياب المعالم الهندسية للخلية الكبدية ومظهر التحوصل وإنتشار الفجوات ونخر مركزي بؤري وحالـة

تدهن كبدي. كما أن نتائج الدراسات الخاصة بالمجهر الإلكتروني تبدي بأن الـ ergoplasm تتشتت جدائله الريبوزومية وتختزل به العشائر الميتوكوندرية وتظهر بها حالات swelling.

إن إرتفاع معدل ناقلات الأمين ALT، AST والتسرب الأنزيمي لـ LDH كمؤشر على حيوية الخلية وكذا تسرب الـ SDH كمؤشر على العطب الميتوكوندري يرفع من مواطن النكرزة البؤرية. فالأثر السام للجذور الألكيلية على الأغشية الخلوية وأغشية العضيات وأختلال تفاعلات الميثلة قد يرتبط مباشرة بعطب القنوات الكالسيومية. إن الإرتشاح الدهني قد يعود إلى تفاعلات الألكلة بالأغشية الحيوية مسببا بذلك حالة haloalkylation وفرط تشكل القطيرات الدهنية من جهاز جولجي. إن العطب الشديد لإنزيمات β-oxidation ينتج عنه حالة تدهن، وحالة swelling وتمزق الغشاء الميتوكوندري الخارجي وتحرر السيتوكروم C يكون مسؤولا عن حالات الموت المبرمج.

إن تراجع العطب الغشائي الذي يعكسه الحد من التسرب الإنزيمي بالدراسات *in vivo* أو *in vitro* يؤكد نجاعة صيانة النظام الدفاعي الجلوتاتيوني ونظام الـ ubiquinol و كذا صيانة الأنظمة الرودوكسية بكل من الميتوكوندريا والميكروزوم قد يكون مرده إلى غنى المستخلص البيتانولي بمشتقات الـفلافونيدات التي تدخلت عبر آليات الأسر الجذري أو المنح الهيدروجيني أو مخلبة المعادن أو تثبيط الأكسدة اللبيدية ومواقع التسرب الإلكتروني أو حفظ التخليق البروتيني.

الأفاق المستقبلية

إن النتائج المتوصل إليها بهذه الدراسة تمد أمامنا بساط الأفاق المستقبلية كما يلي:

- التنقيب عن الأحماض الفينولية بالمستخلص البيتانولي والتي قد يعزى إليها الدورالبيولوجي
- إختبار فعالية المركبات المعزولة في تعزيز النظام المناعي الذي لا يمكن إقصاؤه كآلية وقائية.
- إختبار فعالية المركبات التي لم تستجب للفعل المانع للأكسدة كمضادات ميكروبية خاصة الأثر antimycobacterium للحد المباشر من داء السل.
- إستغلال المركبات التي أبدت سلوكا محرضا للـ swelling و الفعل prooxidant كآلية للقتل الخلوي و الفعل المضاد للطفور و الأورام في تجارب الـ cytotoxicity.
- لايستغنى عن النبتة *C. vulgaris* وتسخيرها لتجارب الـ cytotoxicity .
- إدراج المركبات المعزولة في النظام االإكلينيكي لمرضى داء السلّ مع مراعاة الجرعة والتركيز.
- إعتماد المركبات المعزولة كمحفزات للتعبير الجيني للنظام الرودوكسي.

الملخص

تعتبر الفلافونيدات أهم المنتجات الطبيعية المرشحة للدور الوقائي والعلاجي لما تتميـز بـه مـن خصائص الدور المانع للأكسدة من خلال تواصلها مع الأنظمة الرودوكسية الـداخل خلويـة. تعتبـر المناطق الصحراوية الجزائرية مخـازن للأصـول الوراثيـة النباتيـة وقـد وقـع الأختيـار علـى *Chrysanthemum fuscatum* والتي أخضعت أول مرة للدراسات الكيميائية والبيولوجية التي أسـفرت عما يلي:

- تعريف البنى الكيميائية على أساس السلوك الكروماتوغرافي ومطيافية UV، ^{1}H NMR، ^{13}C NMR ، مطيافية الكتلة و تجارب الـHMBC إذ أمكن الوصول إلى 17 مركبا عرف بنيويـا منها 5 مركبات (8C2 ، 8C3 ، P7 ، 114 ، 11E) بينما حددت عائلات باقي المركبات السبعة لينتمي أحدها إلى عائلة الـisoflavone وثلاث منها إلى عائلة الـفلافونول بينما ينتمـي إلـى عائلة الفلافون 4 مركبات.
- أظهرت إختبـارات الفعـل المـانع للأكسـدة *in vivo* و*in vitro* أن المسـتخلص البيتـانولي لـ*C. fuscatum* حقق فعلا وقائيا عند 200 mg/Kg مقارنة بـالمسخلص البيتـانولي لـ *H. cheirifolia* وعجز عن ذلك *C. vulgaris* .
- إستجابت المركبات 8C2 و114 المعزولة من *C. fuscatum* للفعل الآسر لـ$O_2^{°-}$ والـDPPH° مقارنة بالـ isoquercitrin.
- إستجاب8C3 للفعل الآسر لـ OH° وللفعل المخلبي للحديد وقاربه في ذلك P7 مقارنة بـrutin والـKaempferol وتتحول هذه المركبات إلى pro-oxidant بالتراكيز الأعلى.
- إستجابت 8D1 ، isoquercitrin وكل من 11F ، E43 ، 8C1 لتثبيط الـLPO المولّد بالنظـام CCl_4/NADPH و استجاب الـ113 وكذا الـkaempferol لتثبيط الأكسـدة اللبيديـة المولّـدة بالنظام Fe^{2+}/ascorbate.
- حقق المستخلص البيتانولي *C. fuscatum* نجاعة معتبرة في تعزيز النظام الجلوتاتيوني ونظـام الـubiquinol بكل من المجنس الكبدي والميتوكوندريا عند mg/Kg 200 وقد إستجاب النظـام الهيماتولوجي لنفس التركيز بالجرذان المعاملة بالـINH وRMP.
- أظهرت الجرعة المنفردة *in vivo* من الـHD سمية معتبرة مقارنة بـAcHD .
- فعل المركبان8C2 و114 صيانة أغشية الـhepatocyte والميتوكوندريا بمنع تسرب الـLDH و الـSDH وعززت النظام الرودوكسي الجلوتاتيوني بالعزلات الكبدية المعاملة بالـHD .
- استجاب النظام الرودوكسي بالميتوكوندريا لكل مـن 8C2، apigenin ، وkaempferol بأسـر الجذر $O_2^{-°}$ وDPPH° وعدل من RCR وكذا P/O ولم يستجب الجهد الغشائي ونشاط المعقدات

I وIV لهذا الفعل ،وأبدت هذه المركبـات دور الـ ـprooxidant ومحرضـة للـ ـswelling بالتراكيز الأعلى.

- أستجاب الجهد الرودوكسي بالنظام الميكروزومي للمستخلاص البيتانولي *C. fuscatum* عند 400 mg/Kg، وثبط الـ P7 و8C3 نوعيا نشاط CYP2E1 بينما ثبط 11E نوعيا نشاط CYP3A4.

أكدت دراسات المجهر الضوئي والإلكتروني والدراسات النسيجية الكيميائية أن الـ hepatocyte تعرضت للـ ـsteatose ونكرزة بؤرية عند معاملة الجرذان بكل من HD وINH +RMP على التوالي، وتراجعت هذه الإختلالات أثر التعاطي المسبق بالمستخلاص البيتانولي *C. fuscatum* وظهر ذلك من خلال صيانة الجدائل الريبوزومية والعشائر الميتوكوندرية وجهاز جولجي. وبناءا على نتائج هذه الدراسة ينصحبإدراج هذه المركبات الفلافونيدية بالطب السريري لمرضى السل مع مراعاة الجرعة والتركيز.

RESUME

Les flavonoïdes, substances naturelles, jouent un rôle protecteur vu leurs proporietés antioxydantes et leurs interactions vis–à-vis au redox intracellulaire. Dans ce travail, *chrysanthemum fuscatum*, une plante utilisée utilisé en médecine traditionnelle, qui n'a été jamais étudiée auparavant, a fait l'objet d'une recherche phytochimique structurale et d'une recherche des effets hépatoprotecteurs et hématoprotecteurs de phase *n*-butanol de l'extrait hydrométhanolique des parties aériennes de la plante. Cette étude comporte deux sections:

Une partie chimique reportant les travaux expérimentaux qui ont abouti après séparation et purification par diverses méthodes chromatographiques à l'isolement de 17 composés flavoniques. La détermination structurale est complète pour 5 produits purifiés et partielle pour 7 autres, parmis lesquels 3 flavonols, des flavones et probablement une isoflavone ont été détectés.

L'étude biologique a donné les résultats suivants:

Les testes antioxydants *in vivo* et *in vitro* ont démontré que l'extrait butanolique de *C. fuscatum* a un effet hépatoprotecteur à une dose de 200 mg/Kg; par contre celui de *C. vulgaris* n'a aucun effet par rapport à celui de *Hertia cheirifolia* qui est prise comme référence.

Les produits 8C2, 114 isolés de *C. fuscatum* sont dotés d'un effet scavenger envers le $O_2^{\circ -}$ et le DPPH° et d'un effet inhibiteur vis-à-vis du LPO issue du systme CCl_4/NADPH.

Le composé 8C3 et le P7 ont un effet scavenger envers le OH°, et un effet chélateur du Fer. A des concentrations élevées, ces composés deviennent prooxydants.

Le 8D1 et l'isoquercitrine (flavonol) ont un effet inhibiteur vis-à-vis du LPO issu du système CCl_4/NADPH. Les composés 113, 8C1, 11F, E43 et 11E ont un effet inhibiteur du LPO issu du système Fe^{2+}/ascorbate.

La dose de 200 mg/Kg de l'extrait butanolique de *C. fuscatum* a induit le système glutathione et le système ubiquinol au niveau de l'homogénat hépatique et au niveau des mitochondries. Cette dose a donné une protection du système hématologique chez les rats traités par les antituberculeux (INH + RMP).

L'étude *in vivo* des métabolites de l'INH a prouvé que l'effet toxique du HD est plus profond par rapport à celui du AcHD.

Les composés 8C2, 114 isolés de *C. fuscatum* sont dotés d'un effet protecteur vis-à-vis des membranes hepatocytaires et mitochondriales en empêchant l'infiltration du LDH et du SDH. Ces composés induisent le système redox glutathione au niveau des cultures cellulaires hépatiques traitées par le HD.

Les composés 8C3, l'apigénine et le kaempférol induisent le système redox mitochondrial par le biais de l'effet scavenger du $O_2^{°-}$ et DPPH°. Néanmoins, ces composés n'ont aucun effet vis-à-vis du potentiel membranaire et de l'activité des complexes I et IV. A de fortes concentrations, ces molécules deviennent prooxidantes et provoquent le swelling.

La dose de 400 mg/Kg de l'extrait butanolique de *C. fuscatum* a induit le potentiel redox au niveau des microsomes. Les composés P7 et 8C3 inhibent spécifiquement le CYP2E1 par contre le composé 11E inhibe uniquement le CYP3A4.

L'étude microscopique et histochimique a confirmé que les hepatocytes ont subit des stéatoses et des nécroses focculaires chez les rats trités par le HD et l'INH +RMP. Ces effets sont modérés lors de la prévention par la dose de 200 mg/Kg de l'extrait butanolique de *C. fuscatum*. Cette modération est plus prononcée au niveau des ribosomes, des mitochondries et de l'appareil de Golgi.

Abstract

The flavonoides, natural substances, play a protective role considering their antioxydant characters and their interactions with the intracellular redox. The *chrysanthemum fuscatum* used in traditional medicine, which never studied, made the object of a structural phytochimic and a hydromethanolic research of the heptoprotector and heamatoprotector effects of the phases butanol of the of the air parts extract.

The chemical led after separation and purification by various chromatographic methods to isolate of 17 compounds flavonic. The structural determination of 5 purified products (11TH, 114, 8C3, 8C2, P7) is complete; and partial for 7 others. One of these last products is isoflavone, 3 flavonoles, the remainder belongs to the family of flavones.

The biological study gave the following results:

Test antioxydant *in vivo* and *in vitro* showed that the butanolic extract of *C. fuscatum* has a hepatoprotector effect with an dose of 200 mg/Kg; on the other hand that of *C vulgaris* does not have any effect.

The 8C2, 114 isolated from *C fuscatum* has a scavenger effect towards $O_2^{\circ -}$ and the DPPH° and an inhibiting effect with respect to the LPO resulting from the systme CCl4/NADPH.

Compound 8C3 has a scavenger towards the OH°, an inhibiting effect with respect to the LPO resulting from the CCl4/NADPH system, and a chelating effect of Fe. At high concentrations, this compound becomes prooxidant.

The P7 and 11E have a chelating effect of Fe and an inhibiting effect of the LPO resulting from the Fe2+/ascorbate system.

The butanolic dose of 200 mg/Kg of the extract of *C. fuscatum* induced the system glutathione and the system ubiquinol in the hepatic homogenate and in the mitochondria. This dose gave a protection of the hematologic system in the rats treated by the antituberculeux ones (INH + RMP).

The study *in vivo* of the metabolites of the INH proved that the toxic effect of the HD is deeper compared to that of AcHD.

The 8C2 and114 isolated from *C. fuscatum* are doted of a protective effect of the hypatocyte and mitochondrial membranes by preventing the infiltration of the

LDH and the SDH. These compounds induce the system redox glutathione the hepatic cellular cultures treated by the HD.

The compounds 8C3, the apigenin, and the kaempferol induce the system redox mitochondrial by the means of the scavenger effect of O2°- and DPPH°.Although, these compounds do not have any effect with respect to the membrane potential and of the activity of complexes I and IV. At high concentrations, these molecules become prooxidant and cause the swelling.

The butanolic dose of 400 mg/Kg of the extract of *C. fuscatum* induced the potential redox inthe microsomes. The compounds P7 and 113 inhibits specifically the CYPÈ1, while the compound 11E inhibits only the CYP3Á4.

The microscopic and histochemical study confirmed that the hepatocytes have sudden steatoses and focular necrosis in the rats treated by the HD and INH +RMP. These effects were moderated at the time of the prevention by the butanolic dose of 200 mg/Kg of the extract of *C. fuscatum*. This moderation is more marked on the ribosomes, the mitochondra, and the Golgi apparatus.

المراجع

Arcella, G. (1978). Clinical pharmacokinetics of rifampicin. Clin harmacokin, 3, 108-127.
Adam, S.E.; Al- Yahya, M.A.; Al-Fartan, AH. (2001). Combined toxicity of *Cussia senna* and *Citrulus colocynthis* in rats. Vet. Hum. Toxicol. 43 (2), 70-72.
Aebi, H. (1974). Catalase Methods of enzymatic Analysis, Bergmeyer H.U. (ed). Vol. 11, 2nd English edn, Verlag Chemie International Deerfield Beach Florida, 673-684.
Aizenman, E.; Hartnett, K.A.; Reynolds, I.J. (1990). Oxygen free radicals regulate NMDA receptor function via a redox modulatory site. Neuron 5: 841-846,.
Akram, J.; Fatema, F.; Zohreh, S.; Hossein, N; (2005). Hepatoprotective activity of *Gundelia tourenfortii*. J. Ethnopharmacol. 101, 233-137.
Allan H. Conney (2003). Induction of Drug – Metabolzing Enzymes a parth to the discovery of multiple cytochrome 40. Ann Rev.Pharmacol. Toxical 43: 1-30.
Allen, R.G.; Balin,A.K. (1989). Oxidative influence on development and differnciation on overview of free radical theory development. Free.Radic.Biol.Med. 6; 631-661.
Allis, J.W.; Robinson, B.L (1994). Akenitic assay for p-nitrophenol hydroxylase in rat liver microsomes. Analytical Biochemestry 219, 49- 52.
Alvarez-Castellanos, P.P.; Bishop, C.D.; Pascul-Villalobos, M.J. (2001). Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (Chrysanthemum coronarium) against agricultural pathogens. Phytochemistry. May; 57 (1): 99-102.
Amit, C.; Kristine, L.W. (2006). Inhibition of human cytochrome CYP1 enzyme by flavonoids of t. Johns wort. Toxicology 217, 194-205.
Ana, I.M.; Ce´sar, V.; Mirjana, J.; Jose, M.S.; Pene´lope, D.; Sa´nchez-G.; Fernando, P.; Jose´, M.L. (2006). Effect of quercetin on metallothionein, nitric oxide synthases and cyclooxygenase-2 expression on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats. Toxicology and Applied Pharmacology 210, 128-135
Anila, L.; Vijayalak Shim, N.R. (2000). Beneficial effects of flavonoids from Sesamum indicum, Emblica officinalis and Mormordica chrantia. Phytother. Res., 14: 592-595.
Ariza, J. (1985). Comparative trial of rifamin-doxycyline versus tetracycline. Streptomycin in the therapy of human tubercullosis. Antimicrob. Agents Chemother. 28, 548-551.
Arjun, H.; Banskota, H.T.; Nhan, T.N.; Sures, H.A.; Takahiro, N.; Shigetoshi, K. (2003). DPPH radical scavenging and nitric oxide inhibitory activities of the constituent from the wood of *Taxus yunnanensis*. Planta. Med. 69, 500- 505.
Arriago, A. P. (1999). Gene expression and thiol redox state. Free. Radic. Biol. Med. 27, 936 – 944.
Awad, H.M.; Boersma, M.G.; Boeren, S.; Van der woude, H.; Van zanden, J.; Van Baladerei, P.J.; Ver voort, J.; Rietjen, I. M. (2002). Identification of *O*-quinonone/ quione methide metabolites of quercetin in a cellular in vitro system FEBS letters 520- 534.
Barth, A.; Muler, D.; Durrling, K. (2002). *In vitro* investigation method of a standardized extract of *citrullus colocynthis* on liver toxicity in adult rats. Exp: Toxicol. Pathol, 54 (3): 223- 230.
Bayoumi, R.A.; Rosalki, S.B. (1976). Evaluation of method of coenzyme activation of erythrocytes for detection vitamins B1, B2, and B6. Clin. Chem., 22, 327-335.
Bellomo, G.; Orrenius, S. (1985). Altered thiol and calcium homeostasis in oxidative hepatocellular injury. Hepatology. 1985; 5: 876-882.
Beron, A., De Beco, V., Lettéron, P Robin, M, . A., Moreau, C., EL kahwaji : J , vertier , N , Feldmann , P , Pessayre , D , (1998). Steatohepatitis – inducing duing cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes , Castroenterology, 114 , 764 – 774 .
Beyer, R.E. (1990). The precipitation of coenzyme Q in free radical production and antioxidation. Free Rad. Biol. Med. PP. 545 – 65.
Blair, I.A.; Mansilla TinoconR.; Brodie, M.J.; Clare, R, A.; Dollery, C, I.; Timbrell, (1985). Plasma hydrazine concentrations in man after isoniazid and hydrazine administration. Hum. Toxicol. 4, 195- 202.
Bluck, M.; Michell, J.R.; Ishak, K. (1975). Isoniazid-associated hepatitis in 114 patients. Gastroenterology 69, 284-302.
Bok, R. K.; Dong, H. K.; Reakil, P.; Kang, B. (2000). Effect of an extract of the rot of scutellaria baica lensis and its flavonoids on Aflotoxin B1 oxidizing cytochrome 450 enzymes. Planta Med 67, 396- 399.
Bokkenher, V.D.; Shackleton, C.H.L .; Wineter, J. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal Bacteroides from humans. Biochem. J. 248:953-956; 1987.
Bolton, J, L.; Trush, M,A.; Penning, T.M.; Prughurst,G.; Monks, T.J.; (2000). Role of quinines in toxico Chemical research in toxicology 13, 135- 160.
Bor, J.Y.; Chen, H.Y; Yen, G.C. (2006). Evaluation of antioxidant activity and inhibitory effect on nitric oxide production of some common vegetables; J. Agric. Food Chem., 54(5), 1680-1686.
Bors, W.; Heller, W.; Michel, C. (1996). Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging

efficiencies. Meth. Enzym. 7, 66-76.
Bors, W.; Saran, M. (1987). Radical scavenging by flavonoids antioxidant. Free rad. Res. Comm. 2, 289- 294.
Boulton, D.W.; Walle, U.K. ; Walle, T. (1998). Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. J. Pharm. Pharmacol. 50: 243-249;.
Boutin, J.A.; Meunier, F. ; Lambert, P.H. ; Hennig, P. ; Bertin, D. ; Serkiz, B. ; Volland, J.P.(1993.). *In vivo* and *in vitro* glucuronidation of the flavonoid diosmetin in rats. Drug Metab. Dispos. 21, 1157-1166.
Bouton. C.; Hirling, H.; Drapier, J.C. (1997.) Redox Modulation of iron regulatory proteins by peroxynitrite. J Biol. Chem. 272, 19969-19975,
Bradfield, C.A.; Bjldanes, L.F.; (1984). Effect of dietary indol -3- carbonil on intestinal and hepatic monooxygenase, Glutathione-S-transferase and epoxide hydrolase activities in the rat. Food Chem. Toxic. 22, 997-982.
Brady. J.F.; Ishizaki, H.; and Yang, C. S.; (1988). Effect of diallyl sulphide on rat liver microsomal nitrosamine metabolism an other monoxygenase activities concer Res, 48, 5937- 5940.
Bray, T. M.; Taylor, C. G. (1993). Tissue glutathione, nutrition, and oxidative stress. Can J. Physiol. Pharmacol. 71: 746 – 751.
Brigelius, R. (1986). Regulation of glucose 6-phosphate dehydrogenase under oxidative stress. In: Rotilio, G.,(Ed.), Superoxide and superoxide dismutase in chemistry, biology and medicine, Elsevier, Amsterdam, pp: 401-403
Burk, M.D.; Thompson, S.; Weaver, R.R.; Wolf, C. R.; Mayer, R.T. (1994). Cytochrome P450 specificities of olkox resorufin o- dealkylotion in human and rat liver. Biochem. Pharmacol. 48 (5), 923- 936.
Cajacob, C.A.; Chan, W.K.; Shephard, E.; Ortiz de Montellano, P.R. (1988). The catalytic site of rat hepatic lauric acid ω-hydroxylase. Protein versus prosthetic heme alkylation in the ω-hydroxylation of acetylenic fatty acids. J. Biol. Chem. 263: 18640-49.
Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behawior of flavonoids: structure- activity relation ships. Free radc. Bioc. Med. 22, 749- 760.
Carmella, L.; Alessandro, F. (2003). Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. Frre. Radic; Biol. Med. 34(1), 1-10
Carrell, R.W.; Winterbourn, C.C.; Rachmilewitz, E.A. (1978. Activated oxygen and haemolysis. Br. J. Haematol. 30, 59-264.
Chatterjee, S. R.; Srivastava, T. S.; Kamat, J. P.; Devasagayam, T. P. A. (1997). Lipide peroxidation indused by a novel porphyrin plus light in isolated mitochondria: Possible implications in photodinamic. Therpy Molecular and Cellular Biochemistry 166, 25–33
Chen, K.; Plumb, G.M.; Bennett, R.N.; Bao, Y. (2005). Antioxidant activities of extracts from five anti-viral medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 96(1-2) 201-205.
Chen, L.; Lee, M-J.; Li, H.; Yang, C.S, (1997.). Absorpation, distrubution and elimination of tea polyphenols in rats, Drug Metab. Dispos 25, 1045-1050;
Cheng, W.; Li, J.; You, T.; Hu, C. (2005). Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of the extracts from the inflorescence of *Chrysanthemum indicum Linne* J. Ethnopharm. 101(1-3), 334-337.
Chimi, H.; Gillard, J.; Gillard, P.; Rahman, M. (1991). Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. J. Amer. Oil. Chem. Oc. 68, 307- 312.
Chiu, D.; Kuyprs, F.; Lubin, B. (1989). Lipid peroxidation in human red cells. Semin. Hematol. 26: 257-276.
Choi, H.S. Moore, D.D. (1993). Induction of C-fos and C-jun gene expression by phenolic antioxidants. Mol. Endocrinol. 7:1596-602.
Clarck, S.D.; Thuillier, P.; Baillie, r.A.; Sha, V.; (1999). Changes in lipids of rat liver after hydrazine injection. Biochem. Pharmacol. 19, 1743- 1752.
Coa, G.; Sofic, E.; Prior, R.L. (1997). Antioxidant and proxidant behaviour of flavonoids: structure- activity relation- ship. Free. Arabic. Bid. Med. 22, 749- 760.
Cody, V.; Mideleton, E.; Haeborne, J.B. (1986). Plant flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure Activity Relationships. ALAN, R. LISS, New York.
Coprean, D.; Giurgea, R.; Rusu, M.; Tamas, M. (1991). Hepatoprotector effect of *Chrysanthemum balsamita* extract in ethanol intoxicated rats. Rev Roum Physiol. 28(1-2), 27-29.
Correa, A.; Ortiz de Mentellano, P.R. (1993). Inhibitors of cytochrome P450 and possibilities for their therapeutic application. In Frontiers in Biotransformation, ed. K Ruckpaul, G Rein, 8:74-146. Berlin: Akademie.
Cotelle, N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. Curr Top Med Chem. 1(6), 569-90.
Cotgreave. I.A. (1998). Stress response. Toxicology in Vitro 12, 569 – 573.
Crompton, (1999) M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. Biochem. J. 341, 233-249.
Dalvi, R. R.; Howell, C. D. (1977). Toxic effects of a fungicide tetrazol, on the hepatic drug- metabolizing enzyme system in mice. Bull. Envir. Contam. Toxic. 17, 225- 232.
Daniel, J.D.; Ac´acio, A.P.; F´abio, E. M.; Tiago, R.; Ieda, M.R.P.; Anaısa, F.C.; Helena, S.; Uyemura, A.; Antonio, C.S.; Carlos, C. (2005). The interaction of flavonoids with mitochondria: effects. on energetic processes.

Chemico-Biological Interactions 152, 67-78
Day, A. J.; Canada, F. J.; Diaz, J.C.; Kroon, P.A.; Mclauchlan, R.; Flauds, C.B.; Plumb, G.W.; Mor gan, M.R.A.; Williamson, G. (2000). Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. FEBS Lett. 468, 166-170.
De Ann J. Liska, (2001). The detoxification Enzyme systems. Altertnative medicine Review 3, 187-198.
De Groot, H.; Rauen, U. (1998). Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. Fundam.Clin.Pharmacol. 12(3), 249-255
Deleve, L.D.; Kaplowitz, N. (1991). Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. Pharmacology & Therapeutics. 52, 287-305.
Dhawan, B.N. (1995); A new hepatoprotective agent from an indian medicinal plant *Picorrhizia kuvroa*. Med. Chem. Res. 5(8), 595-605.
Di Lisa, F.; Menabo, C.; Petronilli, V. (1998). The role of mitochondria in the salvage and the injury of the ischemic myocardium, Biochim. Biophys. Acta. 1366, 69-78.
Diwan, F.H.; Abdel-Hassan, I.A.; Mohammad, S.T. (2000). Effect of saponin on mortality and histopathological changes in mice. East. Moditerr Health. J.
Dodge, J.T.; Mitchell, C.; Hanahan, D. (1963). The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. Arch. Biochem. 100, 119-130.
Dononan, J.L.; Water house, A.L. (2003). Bioavailability of flavanol monomers in rice Evans, C, Packer L, eds flavonoids in health and disease. Marcel Dekker, New York, 413-440.
Donoso, P.; Rodriguez, P.; Marambio, P. (1997). Rapid kinetic studies of SH oxidation-induced calcium release from sarco plasmic reticulum vesicles. Arch Biochem Biophys 341, 295-299.
Dormandy, T.L. (1985). The antioxidation of red cell. Br. J. Haematol., 20, 457-461.
Drhuzennova Chs, Zhirnov GV, Andrianov NV, Archarkou AI. (1983). Effect of antitubercular preparation on the isoform composition Puro of rat liver microsomes. Biull Eksp Bid Med, 95 (2), 44 – 46.
Durate Silvia, I.; S.; R. A. ; Gaspar, J. ; Maia, R. ; Laires, A. ; Rueff, j. (1997). Involement of rat cytochrome 1A1 in the biotransformation of kaempferol to quercetin: relevance to the genotoxicity of kaempferol. Mutagenesis 12, 383-390..
Elangovan, V.; Sekar, N.; Govindasamy, S. (1994). Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20-menthylcholanthrene-induced tumorigenesis. Cancer Lett 87: 107-113.
Ellis, J. (1986). Drugs used in tuberculosis and leprosy. In side effects of drugs. Annual 10, edited by M.N.C. Dukes, Elsevier, Amesterdam, New York, Oxford, 269-276.
Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics 82, 70-77.
Ellnain, M.; Kurczyn'sk, Z.; Kasprzak, J. (2003). Investigation of the free radical scavenging activity of Ginkgo biloba L. Leaves. Fitoterapia 74, 1- 6.
Emaus , R . K . ; Grunwald, R . ; lemaster , J . J. (1988). Poxontul Rhodamine 123 as a probeof Fruns membrane potenfil in isolatedrat-liver mitochondria and metabolic properties. Biochem. Biopphys. ACTA 850, 436-446
Erlund, I.; Kosonen, T.; Alfthan, G.; Maenpaa, J.; Perttunen, K.; Kenraali, J.; Parantainen, J.; Aro, A. (2000). Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers, Eur. J. Clin. Pharmacol. 56, 545-553.
Evren, Ö.U.; Ali, K.; Nazlı, A. (2006). Antioxidant activity of *Viscum album* ssp. A*lbum*. Fitoterapia 77, 7-8

Fanas' ev, I.B.; Dorozhkao, A.I.; Brodkii, A.V.; Korsstyuk, U.A.; Potapovich, A.L. (1984). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. Biochem. Pharmacol. 38, 1763- 1769.
Farombi, E.O.; Ekor, M. (2006). Curcumin attenuates gentamicin-induced renal oxidative damage in rats. Food and Chemical Toxicology 44(9), 1443-1448
Ferry, D.R .; Smith, A.; Malkhandi, J.; Fyfe, D. W.; de Takats, P. G.; Anderson,D.; Baker, J.; Kerr, D. J. (1996) Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinties and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. Clin. Cancer Res., 659-66.
Flohé, L., Otting, F., (1984). Superoxide dismutase assays. Methods in Enzymology 105, 93-104.
Formica, J.V.; Regelson, W. (1995). Review of the biology of quercitin and related bioflavonoids. Food. Chem. Toxicol. 33, 1061-1080.
Foster, B.C.; Vandenhoek, J.H.; Krantis, A.; Akhtar, M. H.; Bryan, M.; Budzinki, J.W.; Ramputh, A.; Arnason, J. T. (2003). *In vitro* inhibition of human cytochrome P450- mediated metabolism of marker substrates by natural products. Phytomedicine 10, 334- 342.
Francis, F.F.; Elizabeth, T.; Cary, R.C.; Timoth, H.S. (2006). Isoniazid hepatotoxicity associated with treatment of latent tuberculosis infection: A 7-year evaluation from a public haealth tuberculosis clinic. CHEST, The Cardiopulmonary and Cirtical Care Journal 18, 116-124.
Franklin, M.R. (1991). Cytochrome P450 metabolic intermediate complexes from macrolide antibiotics and related compounds. Methods Enzymol. 206: 559-73.

František, S.; Tomas, V.; Julius, A.; (2006). Silymarin and its components scavenge phenylglyoxylic ketyl radicals. Fitoterapia 77, 525-529
Frei, B.; Kim, M.C.; Ames, B.N. (1990). Ubiquinol -10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 87, 4879-4883.
Freya, A.S.; Garry, R.B. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. Free Radical Biology & Medicines 30(11), 1191-1212.
Fridovich, I. (1986). Biological effects of the superoxide radical. Arch. Biochem. Biophys. 247, 1-11.
Furesz, S. (1970). Chemical and biological prosperties of rifampicin Antibiotica et chemotherapie. 16: 316-351.
Gabriele, B.; Mattias, F.; Melzig. (2003). Effects of selected flavonoids and caffeic acid derivatives on hypoxanthine-Xanthine oxidase induced toxicity in cultivated human cells. Planta. Med. 69, 1125- 1129.
Galati, G.; Moridani, M. Y.; Chan, T.S.; O'Brien, P.J. (2001). Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: glutathione oxidation and conjugation. Free Radic. Biol. Med. 30, 370-382.
Galisteo, M.; Suarez, A.; Montilla, M.P.; Fernandez, A.; Gil, A.; Navarro, M.C; (2006). Protective effects of *Rosmarinus tomentosus* ethanol extract on thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. Phytomedicine 13.101-108.
Gasdaska, J.R.; Kirkpatrick, D.L.; Montfort, W.; Kuperus, M.; Hill, S.R.; Berggren, M.; Powis, G. (1996). Oxidative inactivation of thioredoxin as a cellular growth factor and protection by a Cys73→ Ser mutation. Biochem Pharmacol 5, 1741-1747.
Gavrilov, V.B.; Gavrilova, A.P.; Mashul, L.M. (1987). Comparative evaluation of methods of determination of lipid peroxidation products in blood serum by thiobarbituric acid test. Vopr. Med. Khim., 33, 118-122.
Gee, J. M.; DuPont, M.S.; Day, A.J.; Plumb, G.W.; Williamson, G.; Johnson, I.T. (2000). Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. J. Nutr. 130, 2765-277.
Gilbert, H.F. (1990). Molecular and cellular aspects of thiol disulfide exchanche. In: Meister,A, ed. Advances in enzumology. New York: Wiley interscience: 69 – 73.
Gonzales, R.; Auclair, C.; Voisin, E.; Gautero, H.; Dhermy, D.; Boivin, P. (1984). Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases. Cancer. Res. 44, 4137-4141.
Gonzalez- Flecha, B ; Demple, B. (1999). Biochemistry of redox signaling in the activation of oxidative stress genes. In Gilbert, Dl; Colton, CA, eds. Reactive oxygens species in biological systems. New York. Kluwer Aaccademy Plenum Publishers. 133 -154
Graefe, E. U.; Witting, J.; Mueller, S.; Riethling, A-K.; Uehleke, B.; Drewelow, B.; Pforte, H.; Jacobash, G.; Derendorf, H.; Veit, M.(2001). Pharmacokinetics and biovailability of quercetin glycosides in humans. J. Clin. Pharmacol. 41: 492-499.
Griffith, **O.W. (1999)**. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. Free Redic – Biol. Med 27: 922 – 935
Griffiths, L. A.; Barrow, A. (1972). Metabolism of flavonoid compounds in germ-free rats. Biochem. J. 130, 1161–1162.
Guen Ggrich, F.P. (1994). Catalyc sele tivity of human cytochrome 450 enzymes relevance to drug metabolism and toxicity. Toxicol lett 70: 133-138.
Guengerich, F.P. (1995). Influence of nutrients and other dietary materials on cytochrome P 450 enzymes. Am J Clin Nutur 1995; 61 (3 Suppl): 651S-658S.
Guillouzo, A.; Morel, F.; Fardel, O.; Meunier, B. (1993).Use of human hepatocyte cultures for drug metabolism studies. Toxicology 82, 209-19.
Guntupalli, M.M.R.; Chandana, V.R.; Palpu, M.; Annie, S. (2006). Hepatoprotective effects of rubiadin, a major constituent of *Rubia cordifolia Linn*. J. Ethnopharmacol. 103, 484-490.
Gurpreet, K.; Sarwar, A.; Zoobi, J.; Kaleem, J.; Mohammad, A. (2006). Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flowers**.** Journal of Ethnopharmacology 108 (3), 340-348
Gutteridge, J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin. Chemistry. U I , 1819- 1828.
Habig, W.M.; Pabst, M.J.; Jacoby, W.B. (1974). Glutathione transferase. J. Biol. Chem., 249, 7130-7139.
Hackett, A. M.; Griffiths, L.A.; Broillet, A.; Wermeille, M. (1983). The metabolism and excretion of [^{14}C] cyanidanol-3 in man following oral administration. Xenobiotica 1, 3279-286.
Hageboom, G.H. (1995). Fractionation of cell components of animal tissues. In: Methods in Enzymology, vol. 1. Ed. S.P. Colowick and N.O. Kaplan.Academic Press, pp.16-19.
Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. Am. J. Med., 91, 14-22.
Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants and human discase: curiosity- cause or consequence Lance, 344: 721- 724.
Halliwell, B., 1996. Oxidative stress. Nutrition and health. Experimental strategies for optimazation of nutritionnal antioxidante intake in humans. Free Radical Research 25, 57-74.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. Arch. Biochem. Biophys. 246, 501-514.
Halliwell, S.; Guilteridge, J. M.C. (1989). Free radicals in biology and medicine 2nd edn, clarendon Press: Ox forod, 416- 494.
Hamed, .; Danny, M. B.; Richard, T.; Mayer (2000). Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP 1A and CYP1B1. Toxicology 144, 31- 38.
Hanasaki, Y.; Ogawa, S.; Fukui, S. (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. Free Radic. Biol. Med. 16 845-850
Handa, S.S., Sharma A.; Chakroborti, K.K. (1986). Natural products and plants as liver protecting drugs. Fitoterapia 57, 307-352.
Harber, F.; Weiss, J. (1934). Th catalytic de composition of hydrogen peroxide by iron salt proceeding of the royal of lon: Methe. and Physical Society 141, 332- 351.
Hartmut, J.A.; Gregorgj, Gore, A.; Hincson, A.; Pessayro, D.; Lemasters, J. (2002) . Mechanisms of hepatotoxicity. Toxicological Scieinces 65, 166 – 167
Hastings, R.C.; Franzblau, S.G. (1988). Chemotherapy of leprosy. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 28, 231-245.
Havsteen, B.H. The biochemistry and medical significance of the flafonoids. Pharmacol. Ther. 96: 67 – 202, 2002
Hayashi, T.; Ueno, Y.; Okamoto, T. (1993). Oxidoreductive regulation of nuclear facor K B. Involvement of a cellular reducting catalyst thioredoxin. J Biol Chem 268:11380-11388..
Hen, K.; Plumb, G.W.; Bennett, R.N.; Bao, Y. (2005). Antioxidant activities of extracts from five anti-viral medicinal plants. J. Ethnopharm. 96(1-2), 201-205.
Hertog, M.G.I.; Hollman, P.C.H.; Van De Putte, B.(1993). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. J Agric Food Chem. 41: 1242-1246.
Hill, C.S.; Treisman, R. (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. Cell 80: 199-211.
Hirono, R.; Sassamoto, W.; Mutsumoto, A.; Itakura, H.; Igarashi, o.; Kondo, K.; (2001). Antroxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. Journal of Nutritional Science and vitaminology (Tokyo) 47, 357-362.
Hodnick, W,F.; Ahmed, S.; Pardini, R, S. (1998). Induction of oxidative stress by redox active flavonoids. Advances in Experimental Medicine and Biology. 439 131- 150.
Hollman, P.C.H.; de Vries, J.H.M.; van Leeuwen, S.D .; Mengelers, M.J.B.; Katan, M.B. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. Am. J. Clin. Nutr. 62: 1276-128.
Horakova, K.; Sovcikova, A.; Seemannova, and al. (2001). Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. Free.Radic.Biol. Med. 30(6):650-64
Houston, S.; Fanning, A. (1994). Current and potential treatment tuberculosis. Drugs 48, 689-708.
Hsin-Ling, Y.; Ssu-Ching, C.; Nai-Wen, C.; Jia-Ming, C.; Mei-Ling, L.; Pei-Chuan, T.; Han-Hsuan, Fu.; Wei-Wan, K.; Hsiao-Chi, C.; Hsuan-Hui, W.; You-Cheng, H.; (2006). Protection from oxidative damage using *Bidens pilosa* extracts in normal human erythrocytes. Food and Chemical Toxicology 44(9), 1513-1521
Hu, M.; Krausz, K.; Chen, J.; Ge, X.; Li, J.; Gelboin, H. L.; Gonzalez, F. J. (2003). Identification of CYP1A2 as the main isoform for the phase 1 hydroxylated isoflavones. Drug Metab. Dispos. 31:924-931..
Huang, M.T.; Wood, A.W.; New mark, H.L.; et al (1983). Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbons by phenolic plant flavonoids. Carcinogenesis 4, 1631- 1637
HunterT and Karin M. (1992). The regular of transcription by phosphorylation. Cell 70, 375-387,.
Husam, S, Y.; Alan, R.; Parrish, I.; Glenn I.S. (2003). The role of hepatocellular Oxidative stress in Kupfer Cell Activation during 1,2- Dichlorobenzene- Induced Hepatotoxicity. Toxicological science 76, 201- 211.
Hussain, S. M.; Frazier, J.M, (2002). Cellular toxicity of hydrazine primary rat hypatocytes. Toxicological Sciences 69, 424-432.
Hyman, C.L. (1995). Tuberculosis: a survey and review of current literature. Curr. Op. in Pulm. Med. 1, 234-242.
Imai, Y.; Sato, R.; (1966). Substrate in treaction with hydroxlase system in liver microsomes. Biochem. Biophy. Res. Commun 22, 620-.
Ioku, K.; Pongpiriyadecha, Y.; Konishi, Y.; Nakatani, N.; Terao, J. (1998). β-Glucosidase activity in the rat small intestine toxard quercetin monoglucosides. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62:1428-1431.
Iwata, H.; Tezuka, Y.; Usia, T.; Kadota, S.; Hiratsuka, A.; Watabe, T.; (2004). Inhibition of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2D6 by extracts from 78 herbal medicines. J. Trad. Med. 21, 42–50.
Jae, S.C.; Hae, Y.C.; Sam, S.K.; Mee, J.J.; Jung, W.K.; Jae, K.N.; Hyun, A.J. (2002). The strucutre-activity relationship of flavonoids as scavengers of peroxinitrite. Phytother. Res. 16, 232-235.
Jaeschke H.; Gores. G. (2002). Mechanism of hepatoxicity. Toxicolyicol. Sciences 65, 166-176.
Janos, J.; Hilscherova, K.; Bla´ha, L.; Holoubek, I.; (2006). Environmental xenobiotics and nuclear receptors-Interactions, effects and in vitro assessment. Toxicology in Vitro 20, 18-37
Javonic,.V.; Steenken, D.; Tosic, M.; Marjanovic, B.; Simic, M.C. (1994). Flavonoids as antioxidants. J. Am. Chem. Soc. 116, 4846- 4851.

Jenner, A. H.; Timbrell, J. A. (1994). Influence of inducers and inhibitors of cytochrom P 450 on the hepatotovicity of hydrazine *in vivo*. Arch. Toxicol. 68, 349-357
Jenner, A.M.; Timbrell, J.A. (1995). *In vitro* microsomal metabolism of hydrazine. Xenobiotica. 25, 599-609.
Jeong, H.G.; Park, H. Y. (1998). The prevention of carbon tetrachloride- induced hepatoxicity in mice by alpha-hederin: P450 2E1 expression.Biochem Mol. Bil Int. 45 (1) 163- 70.
Jeong, H.G.; You, H.J.; Park, S.J, Moon, A.R.; Chung Y.C.; Kang, S.K.; Chun, H.K. (2002). Hepatoprotective effects of 18 beta-gly cyrrhetinic acid on carbon tetrachloride- induced liver injury: inhibition of cytochrome P450 2E1 expressio**n.**
Jong, C.P.; Won, D.H.; Jeong, R.P.; Seong, H.C.; Jong W.C. (2005). Changes in hepatic drug metabolizing enzymes and lipid peroxidation by methanol extract and major compound of *Orostachysjaponicus*. Journal of Ethnopharmacology 102, 313-318
Jovanovic, S.V.; Steenken,S.; Simic, M.G.; Hara,Y. (1997). Antioxident properties of flovonoids. Reduction potential and election transfer reactions of flavonoids radicals in “Flavonoids in health and disease”. (C.A Rice Evans and L. Pacter, eds). Pp. 137- 161, Dekker, New York.
Judy, L.R.; Jerome, L.; Kazuaki, O.Z.; Veronica, Z. (2004). Regulation of CYP2E1 by Ethanol and Palmitic Acid and CYP4A11 by Clofibrate in Primary Cultures of Human Hepatocytes. Toxicological Sciences 79, 233-241
Kamat, P.; kuitin, K.; Bloor, A.; thoms, P. A.; Deusagayam, S. R. (2000). Antioxidant properties of *Asparagus racenosus* againts damge indused by γ radiation in rat liver mitochondria. J.Ethrnophmacol. 71, 425 -435.
Kanco, Y.; Iguchi, S.; Kubo. H.; Iwagir, N.; Matsuyama, K, (1984). Tissue distribution of hydrazine and its metabolites in rats. J. Pharmacobiodyn. 7, 556-562.
Kang, T.H.; Cho, H.; Oh, H.; Sohn, D.H.; Kim, Y.C. (2005). Flavonolglycosides with free radica-scaveniging activity of *Saururus chinensis*. Fitoterapia 76, 115-117.
Kanokwan, J.; Kanniba, D.; Cattaleya, M.; Thewarach, L.; Supawadee, D.; Pradit, P.; Bung-orn, (2006). Impact of *Andrographis paniculata* crude extract on mouse hepatic cytochrome P 450 enzymes. Journal of Ethnopharmacology .
Katalir. M.; Eszter, H.; Laszlo, V (2004). Inhibition of cytochrome P450 enzymes participating in p- nitrophenol hydroxylation by drugs known as CYP2E1 inhibitors. Chemico- Biological Interactions 147, 331-340.
Katalir. M.; Eszter, H.; Laszlo, V (2004). Inhibition of cytochrome P450 enzymes participating in p- nitrophenol hydroxylation by drugs known as CYP2E1 inhibitors. Chemico- Biological Interactions 147, 331-340.
Kato, T.; Noguchi, K.; Sakanashi, M.; Miyamoto, Y.; Suekawaa, M.; Aburada, M.; Hosoya E. (1986). Effects of the water extract of *Chrysanthemum indicum* Linn. On coronary and systemic hemodynamics in the dog. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 280 (2), 241-53
Kawabe, M, Lin C, Kimoto N and al.(2003). Modifying effects of propolis on MeIQx promotion of rat hepatocarcinogenesis and in a female rat two-stage carcinogenesis model after multiplecarcinogen initiation Nutr.Cancer. 37(2), 179-186
Keith, T.J.; David, J.D.; Richard, W.; Voellmy, C.; Stephen, M.; Robert, S. (2006). Increased hepatotoxicity of acetaminophen in Hsp70i knockout mice. Toxicology and Applied Pharmacology 210, 157-162
Kerstin, E.; Philipp, A.L.; Daniela, S.K.; Barbara, A.K; Olivier, N.; Thomas, W.; Stephan, M.H.; Christophe, D.; Florian, L.; (2006). Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions.Toxicology and Applied Pharmacology 210, 116-122
Khallouki, F.; Hmamouchi, M.; Younos, C.; Soulimani, R.; Bessiere, J.M.; Essassi E.M. (2000). Antibacterial and molluscicidal activities of thee essential oil of *Chrysanthemum viscidehirtum*. Fitoterapia. Sep; 71 (5): 544-6.
Kim, K.J.; Kim, Y.H.; Yu, H.H.; Jeong, S.I.; Cha, J.D.; Kil, B.S.; You, Y.O. (2003). Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *chrysanthemum boreale*. Planta Med. 69 (9), 859-61.
Kondo, K.; Kurihara, M.; Miyata, N. and al. (1999). Scavenging mechanisms of (-)-epigallocatechin gallate and epicatechin gallate on peroxyl radicals and formation of superoxide during the inhibitory action. Free Radic Biol Med. 27(7-8), 855-863
Kong, L.D.; Cai, Y.; Huang, W.W.; Cheng, C.H.; Tan, R.X. (2000). Inhibition of xanthine oxidase by some chinese medicinal plants used to treat gout. J Ethnopharmacol. 73 (1-2), 199-207.
Koop, D.R. (1992). Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P 45502E1.FASEB J.6 .724-730.
Korshunov, S.S.; Skulachev, V.P.; Starkov, A.A. (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. Febs Lett. 416, 15-18.
Koster, J.F.; Slee, R.G. (1983). Lipid peroxidation of human erythrocyte ghosts induced by organic hydroperoxides. Biochim. Biophys. Acta. 752, 233-239.
Kowaltwoski, A.J.; Castilho, R.F.; Vercesi, A.T. (2001). Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. FEBS Lett. 495, 72-
Krebs, H.; Gascoyne, T. (1968). The redox state of the vicotinamide adenine dinucleotides in rat liver homogenates. Biochem. J. 108, 513-520.
Kritin, W. G ; Cai. J ; Thampson S.A; Diaz,D; Kavanagh, T.J; Jones, D.P. (1999). Glutathione redox potential in response to differentiation and enzym inducers. Free Radic. Biol. Med. 27, 1208-1218.

Kumat, J.P.; De Vasagayam, T.P.A. (2000). Oxidative damage to mitochondria in normal and cancer tissues, and its modulation. Toxicology 155, 73-82.
Kuhnnau J. (1967). The flovanoids. A class of semi-essential food components: their role in human mutation world. Rev. Nut. Diet 24, 117-191.
Kuo, J.M., Yeh, D.B.; Pan, B.S. (1999) Rapid photometric assay evaluating antioxidants in edible plant material. J Agric Food Chem. 47 (8): 3206-9.
Lahouel, M.; Boulkour, S.; Segueni, N.; Fillastre, J.P. (2004). Chemopreventive effect of flavonoides against the toxicity of cyclophosphamide, vinblastine and paracetamol by inhibition of lipid peroxydation and increasing glutathione levels in hepatic rats. Heama. 7(1), 59-67
Lang, J.K.; Gohil, K.; Packe, L. (1986). Similtaneous determination of tocopherol, ubiquinol and subcellular fractions. Analytical Biochemistry 157, 106-116.
Laugthon, M.J.; Halliwell, B.; Evan,P.J.; Hoult,J.R. (1989). Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. Biochemicol Pharmacology 38, 2859- 2865.
Lauterburg, B. H.; Smith, C.V.; Todd, E. L.; and Mitchell, J.R.; (1985). Pharmacokinetics of the toxic HD metabolites formed from isoniazid in humans. J. Pharmacol. Exp. Ther. 235, 566- 570.
Lawghton, M, J.; Evans, P, J.; Moroney, M, A.; Hoult, J.R. C.; Halliwell, B. (1991). Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclooxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives: relation ship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability- Biochem Pharmachol, 42, 1673- 1681.
Lawrence, H.A.; Burk, R.F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat Liver. Biochemical and Biophysical Research communications 71, 952-958.
Lee, J.R.; Yang, M.S.; Jang, D.S.; Ha, T.J.; Park, K.M.; Lee, C.H.; Kho, Y.H.; Park, K.H. (2001). A new guaianolide as apoptosis inhibitor from *Chrysanthemum boreale*. Planata Med. 67 (6): 585-7.
Lee, W.M. (1995). Drug-induced hepatotoxicity. N Engel J Med 33, 1118-1127.
Leinweber, B.; Machrt, R. (1976). Animal experimental studies on the problem of liver damage by antitubercular agents (rifampicin and isoniazid) by means of galactosamine model. Verth Dlsch Ges In Med, 82 1: 300 – 303.
Lenaz, G., De Santis, A (1985). Coenzyme Q., ed. By Lenaz G., John Wiley & Sons, Chichester, pp. 165-199.
Levine, R.L.; Garland, D.; Oliver, C.N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A.G.; Ahn, B.W.; Shaltiel, S.; Stadtman, E.R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Meth. Enzym., 186: 464-487.
Li, Y.O.(1981). Protective effect of *Chrysanthemum indicum* extract (CI-2) on myocardial injury in cultured neonatal rat heart cells deprived of oxygen and glucose. Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 1(2), 93-7.
Ligeret H, Barthelemy S, Zini R and al. (2004). Effects of curcumin and curcumin derivatives on mitochondrial permeability transition pore. Free Radic. Biol. Med.; 36: 919-929
Loguercio, C.; Alessandro, F.; (2003). Oxidative stress inviral and alcoholic hepatitis. Free radical and medicine, vol 34, n°1 pp 1-10.
Lotito, S. B.; Froga, C.G.; (1998). Catchin prevents human plasma oxidation. Free radical. Boil. Meb. 24, 435-441.
Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193, 265-275.
Lu, S. C. (1999). Regulation of hepatic glutathine synthetic: current concept and controversies. FASEB. J. 13, 1169 – 1183.
Luciana, L.; Mensor.; Fibio, S.; Menezes.; Gilde, G.; Leitao, Alexandre, S.; Reis, Tereza, C, dos Santos, Cintia, S. Cube Suzana G. (2001). Screening of Brozilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. Phytotherapy research 15, 127- 130.
Lynch, R.E.; Fridovich, I. (1978). Effects of superoxide on the erythrocyte membrane. J. Biol.Chem. 253, 1838-1841.
Lysandro, P.B.; Cristina, W.N.; Rodrigo, B.P.; Joao, B.T.R.; Gilson, Z. (2006). Acute liver damage indueced by 2-nitropropane in rats: Effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. Chemico-Biological interactions 160, 99-107.
Macdougall, L. (1972). Red cell metabolism in iron deficiency anemia; III. The relationship between glutathione peroxidase, catalase, serum vitamin E, and susceptibility to iron-deficient red cells to oxidative hemolysis. J. Pediatr. 80, 775-782.
Manach, C.; Morand, C.; Demigné, C.; Texier, O.; régérat, F.; and Rèmèsy, C. (1997). Bioavailiebility of rutin and quercetin in rats. FEBS lett 409, 12- 16.
Manach, C.; Texier, O.; Morand, C.; Crespy, V.; Régérat, F.; Demigné, C.; Rémésy, C. (1999). Comparaison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats. Free Rdiac. Biol. Med. 27:1259-1266.
Marcella, M.; Ruben, D.; Pietro, G.; Grazia, S., Elena, B.; Mario, M.; (2006). An in *vivo* and in *vitro* comparison of CYP gene induction in mice using liver slices and quantitative RT-PCR. Toxicology in Vitro 20, 125-131
Maria M.; Kyriakos R.; Dimitrios, G. (2005). Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: The role of iron chelation. Free Radical Biology & Medicine 39, 591-1600

Marıa, A.M.; Angeles, A.; Juan P.B., Ignacio, L. (2005). Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. Free Radical Biology & Medicine, 39, 1291-1304
Mariken, J.T.J.A.; Guido, R.M.M.H.; Hans-Peter, V.; Alt, B. (2004). Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. FOOD Chem. Toxicol., 42, 45-49.
Masae, I.; Keiko, M.; Masataka, Y.; (2005). Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation Food and Chemical Toxicology 43, 461- 466
Mastura, T.; Yamada, K.; Kawasaki, T. (1991). Changes in the content and intracellular distribution of coenzyme Q homologues in rabbit liver during growth. Biochem. Biophys. Acta 1883, 277-282.
Matsuda, H.; Morikawa, T.; Toguchida, I.; Harima, S.; Yoshikawa, M. (2002). Medicinal flowers. VI. Absolute stereostures of tow new flavanone glycosides and a phenylbutanoid glycoside from the flowers of *Chrysanthemum indicum L.*: their inhibitory activities for rat lens aldose reductase. Chem Pharm Bul. (Tokyo) 50 (7), 972-975.
Matsushita, M.; Irino, T.; Komoda, T.; Sakagishi, Y. (1993). Determination of protein by a reverse method combined with the copper chelate reaction. Clia. Chim. Acta. 216, 103-111.
Matthews, J.R.; Wakasugi, N.; Virelizier, J.L.; Yodoi, J. Hay, R.T. (1992). Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kB by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. Nucleic Acids Res 20, 3821-3830.
Maud, K.M.; Hannington, O.O. (2007). Medicinal plants used to induce labour during childbirth in western Uganda. Journal of Ethnopharmacology 109, 1–9
Maurel, P. (1996). The CYP3 Family. In: Ioannides C, ed. Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc. 241-270.
May, J.M.; Mendiratta, S.; Hill, K.E.; Burk, R.F; (1997). Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. J Biol Chem 272, 22607-22610.
McKinnon, R.A.; McManus, M.E. (1996). Localization of cytochromes P450 in human tissues: implications for chemical toxicity. Pathology. 28, 148-155.
Meredith, C.; Scott, M.P.; Renwick, A.B.; Price, R.J.; Lake, B.G., (2003). Studies on the induction of rat hepatic CYP1A, CYP2B, CYP3A and CYP4A subfamily form mRNAs in vivo and in vitro using precision-cut rat liver slices. Xenobiotica 33, 511-52
Metodiewa, D.; Jaiswal, A.K.; Cena, N.; Dickancaite, E., Segara- Aguilar. J. (1999). Quercetin may act as a cytotoxic proxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. Free radical biology and medicine 26, 107- 116.
Michiharu, K.; Hitomi, N.; Hiroto, F.; Sshuichi, T.; Tatsuya, T.; Akina, T.; Yukako, I.; Nobuhito, S.; Kanji, T (2005). Effect of Chronic administration of ritonavir on function of cytochrome, p 450 3A and P- glycoprotein in rats. Biol. Pharm. Bull. 28 (1) 130- 137
Milde, J.; Elsttner, E.F.; Grabmann, J. (2004). Synergistic inhibition of low-density lipoprotein oxidation by rutin, γ-terpinene, and ascorbic acid. Phytomedicine 11, 105-113.
Millis, S.; Bone, K. (2000). Principles of practice of phytotherapy; Churchill Livingstome, pp 313-318.
Miro.O; Casademont. J; Barrientos, A; Liubano, M.A ; Cardellach . F. (1998). Mitonchondrial Cytochnome C oxidase in hibition during a cute carbon monoxiode porsoning.
Miroslov, M.; Renata, K.; Pavla, H. ; Vaclovs (2001). Chemoprotective potentials of himoisoflavonoid and chalcones of *Dracaena cinnabari*: modulations of drug- metabolizing enzymes and antioxidant activity. Phytother. Res. 15, 114- 118.
Misra, H.P.; Fridovich, I. (1972). The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. J. Biol. Chem. 147, 6960-6962.
Mitchall. JR, Jallow DJ. (1975). Metabolic activation of drugs to toxic substances. Gastroenterology. 68: 392-410.
Mitchell, J.R.; Thorgeirsson, U.P.; Black,M.; Timbrell, J.A.; Snodgrass, W.R.; Potter, W.Z.; Jollow, H.R.; and Keiser, H.R. (1975). Increased incidence of isoniazid hepatitis in rapid acetylators: possible relation to hydrazine metabolites, Clin. Pharmacol. Ther. 18, 70- 79.
Miyake, Y.; Shimoi, K.; Kumazawa, S.; Yamamoto, K.; Kinae, N.; Osawa,T.(2000).Identification and antioxidant activity of flavonoid metabolites in plasma and urine of eriocitrin-treated rats. J. Agric. Food Chem. 48, 3217-3224.
Moldens, P.; Hogberg, J.; Orrenius, S. (1978). Isolution and use of liver cells methods enzymol, 52, 60- 71.
Monteiro, H.P.; Abdalla, D.S.P.; Arcuri, A.S. and Bechara, E.J.H. (1986). Generation of active oxygen species during coupled autoxidation of oxyhemoglobin and δ-aminolevulinic acid. Biochim. Biophys. Acta 881, 100-106.
Mookan, P.; Rangasamy, A.; Thiruvengadam, D. (2000). Protective effect of *Hemidesmus indicus* against rifampicin and isoniazid induced hepatotoxicity in rats. Fitoterapia 71, 55-59.
Moon, J.H.; Nakata, R.; Oshima, S.; Inakuma, T.; Terao, J. (2000). Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by women. Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol. 279: R461-R467;.
Moon, J.H.; Tsushida, T.; Nakahara, K.; Teao, J. (2001). Identification of Quercetin 6-O-B-D- glucuronide as an

antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. Free Radic. Biol. Med. 30: 1274-1285;
Moon,T.; Chi, M. H.; Kim, D.-H.; Yoon, C.N.; Choi, Y.S. (2000) .Quantitative structure-activity relationships (QSAR) study of flavonoid derivatives for inhibition of cytochrome P450 1A2. Quand.Struct- Act. Relat. 19:257-263.
Morales, A.I.; Vicente-Sánchez, C.; Santiago, S.J.M.; Egido, J.; Mayoral, P.; Arévalo, M.A.; Fernández-Tagarro, M.; López-Novoa, J.M.; Pérez-Barriocanal, F. (2006). Protective effect of quercetin on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats is based on its antioxidant properties. Food and Chemical Toxicology 44(12**),** 2092-2100
Morand, C.; Crespy, V.; Manach, C.; Besson, C.; Demigné, C.; Rémésy, C. (1998). Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. Am. J. Physiol. 275: R212-R219.
Morel, G.; Gossee, B.; Lambert, A.M.; Binet, S. (1999). Evaluation of rat hepatic CYP2E1 activity in function of age, sex and inducers: choice of an experimental model capable of testing the hepatotoxicity of low molecular weight compounds. Toxicology Letters 106, 176-780.
Morel, I.; Lescoat, G.; Cogrel, P.; (1993). Antioxidant and iron chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diasmetin on iron- loaded rat hypatocyte cultures. Biochem. Pharmacol. 205- 211.
Moridani, M.Y.; Pourahmad, J.; Bui, H.; Siraki, A.; O'Brien, P.J. (2003). Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective radical scavengers. Free Radic. Biol. Med. 34, 243-253.
Morin, D.; Barthelemy, S.; Zini.; Lbidalle , S.; Tillement; J. P. (2001). Curcumin induces the mitochondrial permeability transition pore mediated by membrune protein thiol oxidation. Febs Letters. 49 T, 131-136.
Mullr, K.; Ziereis, K.; Paper, D. H. (1998). Aquifolium: protection againt enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation. Planta. Med. 64, 536- 540.
Murray M. 1987. Mechanisms of the inhibition of cytochrome P-450-mediated drug oxidation by therapeutic agents. Drug Metab.Rev. 18:55-81.
Murray, M. (1992). P 450 enzyme inhibition mechanims, genetic regulation and effets of liver diserde. Clin. Pharmacokinet 23: 132 – 146
Nakamura, H; Nakamura, K; Yodoi. J. (1997). Redox regulation of cellular activation. Annu. Rev. Immunol. 15: 351-369
Nakanishi, I.; Uto, Y.; Ohkubo, K. (2003). Efficient radical scavenging ability of artepillin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. Org. Biomol. Chem.; 71(9): 1452-1454
Nariman, S. (1988). Adverse reactions to drugs used in the treatment of tuberculosis. Adv. Drug React. Acute Pois. Rec. 4, 207-227.
Nash, T. (1953). The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsh reaction. Biochem. J. 55, 416- 421.G
Ndanusa, B.U.; Mutapha, A.; Abdu A.I (1997). The effect of single dose of rifampicin on the pharmacokinetic of oral nidedipine. J. Pham. Bioed. Anal 15, 1571- 1575.
Nevin, K. G.; Vijayammal, P.L; (2005). Effect of *Aerva lanata* against hepatotoxicity of carbon tetrachloride in rats. Environmental Toxicology and Pharmacology 20, 471-477.
Newton, D. J.; Lu, R.W., A. y. H, (1995). Cytochrome P 450 inhibitors: evaluation of specifities in invitro metabolism of therapeutic agent by human liver microsomes . Drug. Metab. Dispos. 23, 154- 158.
Nielsen, S. E.; Breinholt, V.; Justesen, U.; Cornett, C.; Dragsted, L. O. (1998). *In vitro* biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes. Xenobiotica 28: 389-401.
Niki, K.; Komuro, E.; Takahashi, M.; Urano, S.; Ito, E.; Terao, K. (1988). Oxidative hemolysis of erythrocytes and its inhibition by free radical scavengers. J. Biol. Chem. 263, 19809-19814.
Noda, A.; Sendo, T.; Ohno, K.; Noda, H.; Goto, S. (1987). Matabolism and cytotoxicity of hydrazine in isolated rat hypatocytes. Chem. Pharm. Bull (Tokyo) 35, 2538- 2544.
Noda. A.; Noda, H.; Misaka, A.; Sumimoto, H.; Tatsumi, K (1988). Hydrazine radical formation catalysed by rat microsomal NADP-H – CYP- 450 reductase.Biochem. Biophys. Res. Commun. 153, 256- 260.
Obameir, M. T.; White, R. E.; Yang. C. (1995). Effect of bioflavonoids on hepatic Cypactivities. Xenobiofica 25 (6), 575- 584.
Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K.; (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid. Analytical Biochemistry 95, 351-358.
Ohshima, H.; Yoshie,Y.; Auriol,S. ; Gilibart, I. (1998). Antioxidant and pro-oxidant action of flavonoids : effect on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion. Free. Radical. Biology and medicine 25 (9): 1057- 1065.
Okuno, H.; Akahori, A.; Sato, H.; Xanthoudakis, S. (1993). Curran T and Iba H, Escape from redox regulation enhances the transforming activity of Fos. Oncogene 8, 695-701.
Ortenberg, E.A. Tazhdinova, S.I. (1984). Comparative evaluation of the effectiveness of hepatoprotective lesions by combined ethanol and tuberculostotatic agents. Farmakol Toksikol. 47, 4, 102 – 105
Osawa, Y.; Pohl, L.R. (1989). Covalent binding of the prosthetic heme to protein: a potential mechanism for the suicide inactivation or activation of hemoproteins. Chem. Res. Toxicol. 2: 131-41.

Otake, Y.; Hsieh, F.; Walle, T. (2002). Glucuronidation versus oxidation of the flavonoid galangin by human liver microsomes and hepatocytes. Drug Metab. Dispos. 30: 576-581.
Ozenda, P. (1958). Flore du sahara septentrional et central. Centre National de la Recherche Scientifique, Imprimerie Louis-Jean Gap (H.A.), p 437.
Pachaikani, R.; Purushothaman, M.; Michal, T.; Larry, W. R.; Bernhard, H.; (2003). Dietary flavonoids modulate PCB-Induced oxidative stress, CYP1A1 induction, and AhR- DNA binding Activity in vacular endothelial cells. Toxicological Sciences 76, 212- 219.
Paganga, G.; Al-hashim, H.; Khodr, H.; (1996). Antioxidant activitie of quercetin and catechin. Redox report 2, 359- 364.
Paglia, D.E.; Valentine, W.N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J. Lab. Clin. Med. 70 158-169.
Palma-Carlos, A.G.; Lourenco, M.G.; Palma-Carlos, M.L.; Oliveira, J.A. (1974) Effect of isoniazide on the metabolism of the pophyrins and the haemoglobinic haem. Sangre (BARC), 19(3): 268-274.
Pan, J.; Xiang, Q.; Renwick, A.B.; Price, R.J.; Ball, S.E.; Kao, J.; Scatina, J.A.; Lake, B.G. (2002). Use of a quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction method to study the induction of CYP1A, CYP2B and CYP4A forms in precision-cut rat liver slices. Xenobiotica 32, 739-747.
Periti P, Mezzei T, Mini E, Novelli A. (1989). Clinical pharmacokinetic properties of the macrolide antibiotics: effects of age and various pathophysiological states. Clin Pharmacokinet.; 16: 193-214.
Pessayre, D.; Allemend. H.; Benoist, C. Benhamou, J.P. (1977). Isoniazid-rifampin fulminant hepatitis. A possible consequence of the enhancement of isoniazid hepatotoxicity by enzyme induction. Gastroenterology. 72: 284-289.
Peter, J.O.; Katie, C.; Paul, M. S (2004). Human and animal hepatocyte *in vitro* with extrapolation *in vivo*. Chemico-Biological Interactions 15, 97-114.
Pietta, P. (2000). Flavonoids as antioxidants. J. Nat. Prod. 63, 1035-1042.
Pietta, P.G.; Simonetti, P.; Roggi, C.; Brusa Molino, A.; Maccarini, L.; Testalin, G.; (1996). Dietary flavonoids and oxidative stress, in natural antioxidants and food quality. J. Kumpulainen and J.T. salonen) pp 249- 255.
Pornpen, P.; Patcharavadee, S.; Somlak, P.; Chaiyo, C.; (2006). The protective effects of *Phyllanthus emblica* Linn. extract on ethanol induced rat hepatic injury**.** Journal of Ethnopharmacology 107(3), 361-364
Prerce, N. E.; Ghatinech, S.; Timbrell, J. A. (1992). Studies on the disposition and metabolism of hydrazine in rats *in vivo*. Hum. Exp. Toxicol. 11, 121-127.
Prostova, J.; chlopcikova S.; Grambal F.; Simanek U.; Lilrichorva, J. (2002). Influence of silymrin and its flavonoligans on doxorubicin *in vivo* on induced lipid peroxidation in rat heat microsomes and mitochondria, a comparison with quercetin .
Quan, L.; Eisuke, F.S.; Yukimi, K.; Manabu, N.; Kozo, U.; Masayasu, I.; (2006). A possible cooperation of SOD 1 and cytochrome c in mitochondria-dependent apoptosis. Free Radical Biology & Medicine 40, 173-181
Raja, S.; Nazeer Ahamed, K.F.H.; Kumar, V.; Kakali, M.; Bandyopadhyay, A, Pulok K. M. (2007). Antioxidant effect of *Cytisus scoparius* against carbon tetrachloride treated liver injury in rats. Journal of Ethnopharmacology 109, 41–47.
Rannug, A.; Alexandrie, A.K.; Persson, I.; Ingelman-Sunber, M. (1995). Genetic polymorphism of cytochromes P450 1A1, 2D6 and 2E1: Regulation and toxicological significance. J Occupational Environ. Med. 37, 25-36.
Ratty, A.K.; Das, N.P. (1988). Effects of flavonoids on non enzymatic lipid peroxidation; structure-activity relation ship- Oncology. 39: 69- 79.
Raucy, J.L. (2003). Regulation of CYP3A4 expression in human hepatocytes by pharmaceuticals and natural products. Drug. Metab. Dispos. 31, 533-539.
Ravanel, P. (1983). Effete differents flavonoids sur l'activité mitochondriale. Plantes Médicinales et Phytotherapique. Tome XVII, 3, 165-172.
Ravi, R.; Arvind, K.S.; Anil, K.R. (2001). Long term effect of Aflatoxin B1 on lipid peroxidation in rat liver rand Kidney: Effect of Picroliv and Silymarin. Phytotherapy Research 15, 307-310.
Rice- Evans, C.A.; Miller, N. D.; Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relation ships of flavonoids and phenolic acids. Free. Rad. Biol. Med. 20, 933- 56.
Rice-Evans, **C.A; (2001).** Flavonoid antioxidants. Curr. Med chem. 8, 797-807.
Robak, J.; Gryglewiski, R.J. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. Biochem.Pharmacol. 37, 837-841.
Robert, W. T.; Huong, H. (1998). Effect of phytochemical on cytochrome. P450 Linked Alekoxyresorufin *O*-Dealkylase activity. Phytother. Res, 12, 89- 93.
Robinson, B.L.; Allis, J.W. (1994). Akenitic assay for p-nitrophenol hydroxylase in rat liver microsomes. Analytical Biochemestry 219, 49- 52.
Roman, Z.; Martin, M.; Zdenek, D. ; Petr, R. ; Jitka, U. ; Vilim, s. ; Pave, A.; (2002). Effect of silybin and its congeners on human microsomal cytochrom. P 450 activities. Phytother. Res. 16, 632- 638.
Romos, S.; Sultalos, L. (1998). Flavonoid- induced alteration in cytochrome P450-dependent biotransformation of the organphosphorus insecticide parathion in mouse. Toxicologie 13, 155-167.

Rustin, P.; Chrétien, D.; Bourgeron, T. and al.(1994). Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. Clin. Chim. Acta.1994; 228: 35-51
Ryan, J.C.; Scott, G.F.; Yuehong, W.; Sang, H.C.; Doel, DS.; Guido, F.P. (2006). Ethnopharmacological evaluation of the informant consensus model on anti-tuberculosis claims among the Manus. J. Ethnopharmacol. In press.
Sadasivan, S.; Lataha, P.G.; Sasikumar, G.M.; Rajashekarm, S.; Shyamal, S.;, Shine, V.J.,(2006). Hepatoprotective studies on Hedyotis corymbosa (L.) Lam. Journal of Ethnopharmacology 106 (2), 245-249.
Saija, A.; Scalese, M.; Lanza, m.; Marzullo, D.; Bonina, E.; Castelli, F. (1995). Flavonoids as antioxidant agent's importonce of their interaction with biomembranes. Free. Radic. Biol. Meb. 19: 481- 486.
Sailaja, R.; Setty, O.H. (2006). Protective effect of *Phyllanthus fraternus* against allyl alcohol-induced oxidative stress in liver mitochondria; J. Ethnopharmacol. in press.
Sandra, V.V.; Carl, L.K.; Harold, H.S.; Cézar, G., F., Patricia, I.O. (2003). Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. Free Radic. Biol. Med., 34(1): 84-92.
Sang, S., Cheng, X.; Stark, R.E.; Rosen, R.T. (2002). Chemical studies on antioxidant mechanism of tea catechins: analysis of radical reaction products of catechin and epicatechin with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. Inorg Med Chem. 10(7), 2233-2237
Sanz, M.J.; Ferrandis, M.L.; Cojudo, M.; (1994). Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. Xenobiotic. (25- 30).
Sapone, A.; Affatato, A.; Canistro, D.; Broccoli, M.; Trespidi, S.; Pozzetti, L.; Biagi, G.L.; Cantelli-Forti, G.; Paolini, M. (2003). Induction and suppression of cytochrome P450 isoenzymes and generation of oxygen radicals by procymidone in liver, kidney and lung of CD1 mice. Mutation Research 527, 67-80.
Sarich, T.C.; Adams, S.P.; Petricca, G.; Wright, G. M. (1999). Inhibition of isoniazid-induced hepatotoxicity in rabbits by pre-treatment with an amidase inhibitor. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 289, 695 - 702.
Sarich, T.C.; Youssefi, M.; Zhou, T.; Adams, S.P.; Wall, R.A.; Wrigt, G.M. (1996). Role of hydrazine in the metabolism of isoniazid hepatotoxicity in rabbits. Archives of Toxicology 70, 835-840.
Sastre, J.; Pallardo, F.V. (.2000). Garcia de la Asuncion J and al. Mitochondria, oxidative stress and aging. Free Radic. Res; 32: 189-198
Sato, Y.; Kamo, S.; Takahashi, T.; Suzuki, Y. (1995). Mechanism of free radical- induced hemolysis of human erythrocytes: hemolysis by water –soluble radical intiator. Biochemistry, 34, 8940-8949.
SKuldt, K.U., Wood, J. M. (1986). The role of thioredoxin reductase in the reduction of free redicals at the surface of the epidermis. Biochem Biophys Res Commun 136, 630-637, 1986.
Schorderet, M. (1992). Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Eddition Frison-Roche Paris.
Schuldt, E.Z.; Farias, M.R.; Ribeiro-do-Valle, R.M.; Ckless, K. (2004). Comparative study of radical scavenger activities of crude extract and fractions from *Cuphea carthagenensis* leaves. Phytomedicine, 11 523-529
Scott; L.N.D; (1998). A review of plant used in the trearment of liver disease. Part I Altern. Med. Rev. 3(6), 410-419.
Seen C.K. (1998). Redox signalling and the emerginy therapeutic potential of thiol antioxidants. Biochem pharmacol. 55, 1747 – 1758
Seglen, P.O (1976). Preparation of isolated rat liver cells. Methods cell Biol, 3, 29- 83.
Seiss, M.H.; Loclerc, J.; Canivenc- Lavier. M. C. ; Rat, P. ; Suschelet, M. (1995). Heterogenous effects of natural flavonoids on monogxygenase activities in human and rat liver microsomes. Toxicol Appel. Pharmacol 130, 73- 78.
Sen, C. K; Packer, L. (1996). Antioxidant and redox regulation of gene transpiration. FASEBJ. 10: 709 – 720
Sendo, T.; Noda, A.; Ohna, K.; Goto, S.; Noda, H. (1984). Hepatotoxicity of hydrazine in isolated rat hypatocytes. Chem. Pharm. Ball (Tokyo) 32, 795- 796.
Sesink, A. L. A.; O'Leary, K.A.; Hollman, P.C.H. (2001). Quercetin glucoronides but not glusoides are present in human plasma after consumption of quercetin -3- glucoside or quercetin-4'-glucoside. J. Nurt. 131, 1938-1941.
Shakelford, R.E; Koufmann, W.K; Paules, K.S. (2000). Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. Free.Radic. Bil. Med. 28, 1387 – 1404.
Shakir, A., khursheed, A., Ansari, M.A., Jafry, H., Kabeer, G., Diwakar, (2000). *Nardostachys jatamansi* protects against liver damage induced by thioacetamide in rats. Journal of Ethnopharmacology 71, 359-363.
Shan, X.; Aw, T.Y.; Jones, D.P., (1990). Glutathione dependent protection against oxidative injury. Pharmacology & Therapeutics 47, 61-71.
Shanmugasundaram, P.; Venkataraman, S. (2006). Hepatoprotective and antioxidant effects of *Hygrophila auriculata* (K/ Schum) heine Acanthaceae root extract. J. Ethnopharmacol. 104, 124-128.
Shenoy, S.D.; Spencer, T.A.; Mercer-Haines, N.A.; Alipour, M.; Gargano, M.D.; Runge-Morris, M.; Kocarek, T.A. (2004). CYP3A induction by liver X receptor ligands in primary cultured rat and mouse hepatocytes is mediated by the pregnane X receptor. Drug Metabolism and Disposition 32, 66-71.
Shih, C.C.; Wu, Y.W.; Lin, W.C. (2005). Aqueous extract of *Anoectochilus formosanus* attenuate hepatic fibrosis

induced by carbon tetrachloride in rats. Phytomedicine 12, 453-460.
Shimoi, K.; Okada, H.; Furugori, M.; Goda, T.; Takase, S.; Suzuki, M.; Hara, Y.; Yamamoto, H.; Kinae, N. (1998). Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-β-glucoside in rats and humans. FEBS Lett. 438: 220-224;.
Shizuo, N.; Noriko, T.; Shigeru, Y.; Yusuke, I. ; Nobumitsu, H.; Kimio, K.; Shinsaku, N.; Frank, J.G.; Shigeo, Y. (2006). The effect of dimethyl sulfoxide on the function of cytochrome P450 2D6 in HepG2 cells upon the co- expression with NADPH- cytochrome P450 reductase. Chemico-Biological interactions 159, 47- 57.
Shizuo, N.; Noriko, T.; Shigeru, Y.; Yusuke, I.; Nobumitsu, H.; Kimio, K.; Shinsaku, N. ; Frank, J.G.; Shigeo, Y. (2006). The effect of dimethyl sulfoxide on the function of cytochrome P450 2D6 in HepG2 cells upon the co-expression with NADPH- cytochrome P450 reductase. Chemico-Biological interactions 159, 47- 57.
Shu-Lan, Y. ; Wei-Yu, W. ; Chin-Shiu, H.; Miao-Lin, H.; (2006). Flavonoids suppresses the enhancing effect of β- carotene on DNA damage induced by 4-(methylnitrosamino)- 1- (3- pyridy 1)-1- butanone (NNK) in A549 cells. Chemico-Biological Interactions 160, 175-182.
Shuning, Z.; Yang, Y.; Huaidong, Y.; Yue, Y.; Guolin, Z.; (2005). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of Chrysanthemum indicium. Journal of Ethnopharmacology 96, 151-158.
Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. Free. Radic. Biol. Med.27: 916 – 921.
Sies, H ; Akerboom, T. P.M. (1984). Glutathione disulfide (GSS6) efflux from cells and tissues – Methods Enzymol. 105: 445 – 451.
Siess, M.H.; Le Bon AM, Canivenc-lavier MC and al. (2000). Mechanisms involved in the chemoprevention of flavonoids. Biofactors. 12 (1-4), 193-197
Siess, M.H.; Le Bon, A.; M., Suschetet, M.; (1992). Dietary modification of drug-metabolizing enzymes activities: Doses response effect of flavonoids. Journal of Toxicology and Environmental Health 35, 141-152.
Silvina, B. L.; Balz, F. (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon? Free Radical Biology and Medicine ***In Press.***
Sinha, B.K.; (1987). Activation of hydrazine derivatives of free radicals in the perfused rat liver. Aspin- trapping study. Biochem. Biophys. Acta 924, 261- 269.
Sini, S.; Latha, P.G.; Sasikumar, J.M.; rajeshekaran, S.; Shyamal,S.; Shine, V.J. (2006). Hepatoprotective studies on *Hedyotis corymbosa* (L.) Lam. J. Ethnopharmacol. in press
Skakun, N.P.; Shman' ko; V.V. (1986). Antioxidant effectiveness in isoniazid-induced lesions of the liver. Farmakologiia Toksikologiia 49(4), 86-89.
Skuluchev, V. P. (1998). Uncoupling new approachers to an old problem of bioenergetics. Biochem. Biophys – Acta- 1363, 100-124.
Snider, D.E. (1984). Six months isoniazied – rifampicin therapy for pulmonary tuberculosis, Report of united states public Health Service Cooperation trial. Am. Rev. Resp, Dis; 129: 573-579.
Soboll, S., Grundel, S.; Harris, J.; Kolb-Bachofen, V.; Ketterer, B.; Sies, H.; (1995). The content of glutathione and glutathione-S-transferase and the glutathione peroxidase activity in rat liver nuclei determined by a non-aqueous technique of cell fractionation. Biochemical Journal 311, 889-894.
Sodhi, C.P.; Rana, S.; Mehta, S.; Vaiphei, K.; Goel, R.C.; Mehta, S.K.; (1997). Study of oxidative stress in rifampicin induced hepatic injury in growing rats with and without protein energy malnutrition. Human Experimental Toxicology 16, 315-321.
Storozhuk, P. G.; Korochanskaia, S. P.; Kolesnikov, V.V.; Gontlakher, I.; Movchan, I. (1989). Effect of antitubercular preparation on enzyme activity of erythrocytes.Vrach. Delo. 4, 81-82.
Strandell, J.; Neil, A.; Carlin, G. (2004). An approach to the in vitro evaluation of potential for cytochrome P450 enzyme inhibition from herbals and other natural remedies. Phytomedicine 11, 98-104
Strolin, Benedetti, M.; Dostert, P. (1994). Induction and auto induction of rifampicin derivatives: a review of animal and human studies. Environ Health Perspect. 1994, 102, 11-5.
Stuart, R. L.; and Grayson, M.L. (1999). A review of isoniazid- related hepatotoxicity during chemoprophylaxis. Aust, N.Z. J. Med. 29, 362- 367.
Subhan,T.U.; Hiroshi, I.; Shigetoshi, K.; Yasuhiro, T. (2006). Mechanism-based inhibition of CYP3A4 and CYP2D6 by indonesian medicinal plants. J. Ethnopharmacol.in press.
Sureshkumar; S.V.; Mishra, S.H. (2006). Hepatoprotective effect of extracts from *Pergularia daemia* Forsk. Journal of Ethnopharmacology 107 (2), 164-168
Suwalsky, M.; Orellana, P.; Avello, M.; Villena, F. (2007). Protective effect of Ugni molinae Turcz against oxidative damage of human erythrocytes. Food and Chemical Toxicology 45, 130–135
Takako, Y.; Young-Ae, K.; Hyun-Young, K.; Takuya, O.; Yasuo, S. (2007). Protective effect of the Chinese prescription Kangen-karyu against high glucose-induced oxidative stress in LLC-PK1 cells. Journal of Ethnopharmacology 109, 113–120
Takenaka, M.; Nagata, T.; Yoshida, M. (2000). Stability and bioavailability of antioxidants in garland (*Chrysantheemum coronarium L.*). Biosci Biotechnol Biochem. 64 (12), 2689-91.
Terao, J. (1999). Dietary flavonoids as antioxidant in vivo: conjugated metabolites of epicatechin and quercetin participate in antioxidative defense in blood plasma. The J. Med Investig. 46(34), 188-168.

Terao, J.; Marriusz, K. P. (1999). Flavonoids and membrane lipid peroxidation, Nutrition 15(10), 790-791.
Terao, J.; Piskula, M.; Yao, Q. (1994). Protective effect of epicatchin, epicatchin gallate and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. Arch. Biochem. Biophys. 308, 278-284.
Terero, J. (1999). Dietary flovariords as antioxidants in vivo: Conjugated metabolites of (-). Epicatechis and quercetin participate in ant oxidative defuse in blood plasma. The journal of medical investigation 46.34.159-168.
Thomas J.A.; Poland, B; Homzatko, R. (1995). Protein Sulfhydryls and their role in the antiovidant function of protein S- thiolation. Arch. Biochem. Biophys. 319: 1 – 9
Thomas, P.D.; pozansky, M.J. (1990). A modified tetramethylbenzidine method for measuring lipid hydroperoxides; Anal; Biochem. 188, 228-232.
Tierney, D.J.; Haas A.L., Koop, D.R. (1992). Degradation of cytochrome P450 2E1: selective loss after labilization of the enzyme. Arch. Biochem. Biophys. 293, 9-16.
Timbrell, J.A.; Mitchell, J. R.; Snodgrass, W.R.; and Nelson, S.D. (1980). Isoniazid hepatotoxicity: The relationship between covalent binding and metabolism in vivo, J. Pharmacol. Exp. Ther. 213, 364- 369.
Toledano MB, Ghosh D, Trinh F and Leonard WJ, (1993) .N- terminal DNA- binding domains contribute to differential DNA-binding specifities of NF- KB p50 and p65. Mol. Cell Biol. 13, 852-860.
Torel, J. (1986). Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. Phytochem. 25, 383-385
Toshihiro, A.; Scott, G.; Franzblaau, M.;, Hiroki, O., Fangqiu, Z., Ken, Y.; Takashi, S.; Yumiko, K. (2005). Antitubercular activity of triterpenoids from Asteraceae Flowers. Biol. Pharm. Bull. 28 (1) 158-160.
Tsyrlov, I.B.; Mikhailenko, V. M.; Gelboin, H.V. (1994). Isozyme-and species-specific susceptibility of cDNA-expressed CYP1A P-450s to different flavonoids. Biochim. Biophys. Acta 1205: 325-335;.
Ubeda, A.; Esteve, M.L.; Alceros, M.J.; (1995). Effect of flavonoids on cytochrome P-450 from rat liver microsomes: inhibition of enzyme activities and protection against peroxidative, Phytotherapy Research 9, 416-420.
Ukiya, M.; Akihisa, T.; Tokuda, H.; Suziki, H.; Mukainaka, T.; Ichiishi, E.; Yasukawa, K.; Kasahra, Y.; Nishino, H. (2002). Constituents of compositae plants. III. Anti-tumor promoting effects and cytotoxic activity against human cancer cell lines of triterpene diols and triols from edible chrysanthemum flowers. Cancer lett. 177(1), 7-12
Ukiya, M.; Akihisa, T.; Yasukawa, K.; Kasahara, Y.; Kimura, Y.; Koike, K.; Nikaido, T.; Takido, M. (2001). Constituents of compositae plants, 2. Triterpen diol, triols and their 3-O-fatty acid esters from edible *Chrysanthemum* flower extract and their anti-inflammatory effects. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(7), 3187-3197.
Urien, S.; Micropharm, K.; (1995). a microcomputer interactive program for the analysis and stimulation of pharmacokinetic processes. Pharm. Res. 12, 1225-1230
Usia, T.; Iwata, H.; Hiratsuka, A.; Watabe, T.; Kadota, S.; Tezuk, Y.; (2006). CYP3A4 and CYP2D6 inhibitory activities of Indonesian medicinal plants. Phytomedicine 13, 67-73
Uwang. C; Sinskey, A. J; Lodish, H. F. (2001). Oxidized redox state of glutathione in the indoplasmic reticulum. Science. 257, 1496-1502.
Vaidyanathan, J.B.; Walle, T. (2003). Cellular uptake and efflux of the tea flavonoid epigallocatechin- 3- gallate in the human intestinal cell line Caco-2. J. Pharmacol. Exp. Ther. 307: 745 -752;.
Valko, M.; Rhodes, C. J., Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological interactions 160, 1-40.
Van Acker Sab, E.; Van den Berg, D.J.; Tromp, M. N.L. (1996). Structural- aspects of antioxidant activity of flavonoids. Free Radic. Biol. Meb. 20, 331- 342.
Velazquez, E.; Tournier, H.A.; Mordujovich, P.; De Bushiazzo, G.; Schinella, G.R. (2003). Antioxidant activity of paraguan plant extracts. Fitoterapia, 74, 91-97.
Victoria, E, R.; Binh chay, M.; Randly, W.; Charlene, A.; Mc Queen, (2004). Hepatic gene expression and lipid. Homoeostasis in C 57 B1/6 Mice exposed to hydrazine or acetyl hydrazine. Toxicol. Sciences, 82, 318- 332.
Wacher, V.J.; Wu, C.Y.; Benet, L.Z. (1995). Overlapping substrate sspecificites and tissue distribution of cytochrome P 450 3A and P-glycoprotein: Implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. Mol Carcinog 1995; 13: 129-134.
Wahlander, A.; Soboll, S.; Sies, H.; Linke, I.; Muller, M. (1979). Hepatic mitochondrial and cytosolic glutathione content and the subcellular distribution of GSH-S-transferase. FEBS Letters 97, 138-140.
Walgren, R.A.; Lin, J-T.; Kinne, R.K.H.; Walle, T. (2000). Cellular uptake of dierty flavonoid quercetin 4'-B-glucosides by sodium dependent glucose transporter SGLT1. Pharmacol. Exp. Ther. 294: 837-843.
Walker, L.J.; Robson, C.N.; Black, E.; Gillepsie, D.; Hickson, I.D. (1993). Identification of residues in the human DNA repair enzyme HAP1 (Ref-1) that are essential for redox regulation of Jun DNA binding. Mol Cell Biol 13, 5370-5376.
Walle, T.; Vincent, T.S. ; Walle, U.K. (2003). Evidence of covalent binding of the dietary flavonoid quercetin to DNA and protein in human intestinal and hepatic cells. Biochem. Pharmacol. 65,1603-1610.
Walle, T.; Walle, U. K.; Halushka, P.V. (2001.). Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. J. Nutr. 131, 2648-265.
Walle, T; Walle, U.K. (2003). The β-D-glucosice and sodium- dependent glucose transporter 1 (SGLTI)-inhibitor

phloridzin is transported by both SGLTI and multidrug resistance-associated proteins. Drug. Metab. Dispos. 3, 1288 -1291.
Walle, U.K.; Galijatovic, A.; Walle, T. (1999). Transport of the flavonoid chrysin and its conjugated metabolites by the human intestinal cell line Caco-2. Biochem. Pharmacol. 58, 431-438.
Walsh, C. (1982). Suicide subsrates: mechanism-based enzyme inactivators. Tetrahedron 38:871-909.
Walubo, A.; Smith, P.; and Folb, P.L. (1998). The role of oxygen free radicals in isoniazid-induced hepatotoxicity. Methods Finds. Exp. Clin. Pharmacol. 20, 649- 655.
Wang, H.; Ye, X.Y.; Ng, T.B. (2001). Purification of chrysancorin, a novel antifungal protein with mitogenic activity from garland chrysanthemum seeds. Biol Chem, 382 (6), 947-951.
Wei-Jiunn, L.; Lan-Feng, W.; Wen-Kang, C.; Chau-Jong, W.; Tsui-Hwa, T. (2006). Inhibitory effect of luteolin on hepatocyte growth factor/scatter factor-induced HepG2 cell invasion involving both MAPK/ERKs and PI3K–Akt pathways. Chemico-Biological Interactions 160, 123-133
White, R.E. (1991). The involvement of free radicals in the mechanisms of monooygenases. Pharmac. Ther. 49:21-42.
Wietholtz, H.; Zyseet, T.; Marchall, H.H.; Generet, K.; Matern, S (1995). The influence of rifampicin treatment on caffeine clearance in healthy man. J. Hepatol. 22, 78- 81.
William son, J. M ; Boettcher, B ; Meister, A. (1982). Intracellular cysteine delivery system that protects against toxicity by promoting glutathione synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. LISA. 79: 6264 – 6249.
Williamson, G.; plumb, G. W.; Uda, Y.; price, K. R.; Rhodes, M. J. C. (1996). Dietary quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the anticarinogenic phase II marker enzyme quinine reductase in Hepal clc 7 cells. Carcinogenesis 17: 2385 – 2387;
Wills, P.J.; Asha, V.V. (2006). Protective effect of *Lygodium flexuosum* (L.) Sw. (Lygodiaceae) against d-galactosamine induced liver injury in rats. Journal of Ethnopharmacology 108 (1), 116-123
Wolffram, S.; Block, M.; Ader, P. (2002). Quercetin-3- glucoside is transported by the glucose carrier SGL1 across the brush border membrance of rat small intestine. J. Nutr. 132, 630-635.
Wolinsky, K. (1979). Non tuberculous mycobacteria and associated diseases.Am. Rev. resp. Dis, 119: 107-159.
Wren, R.C. (1989). Potter's new cyclopedia of botanical drugs and preparations. Saffron Walden: Daniel
Wrighton, S.A.; Stevens, J.C. (1992). The human hepatic cytochromes P 450 involved in drug metabolism and hepatoxicity. Semin Liver Dis 10: 235-250.
Yamamoto, N.; Moon, J.-H.; Tsuhida, T.; Nagao, A.; Terao, J. (1999). Inhibitory effect of quercetin metabolites and their related derivatives on copper ion-induced lipid peroxidation in human low-densty lipoprotein. Arch. Biochem. Biophys. 372:347-354.
Yamamoto, Y.; Niki, E.; Eguchi, E.; Kamia, Y.; Shimasaki, H. (1985). Oxidation of biological membranes and its inhibition. Free radical chain oxidation of erythrocyte ghost membranes by oxygen. Biochim. Biophyis. Acta 819, 29-36.
Yang, C.Y.; Chao, P.D.L.; Hou, Y.C., Tsai, S.Y.; Wen, K.C.;. Hsiu, S.L (2006). Marked decrease of cyclosporin bioavailability caused by coadministration of ginkgo and onion in rats. Food and Chemical Toxicology 44(9), 1572-1578
Yasuna, K.; Naomi, O.; Tadanou, S.; Shogot, T.; Takashi, T.; Takemi, Y.; Toshinou, Y.; (2001). Effect of 4- (4-Chlorobenzyl) pyridine on rat hepatic microsomal cytochrom P450 and drug metabolizing enzymes in vivo and in vitro.
Yina, J.; Wenberg,R.P;; Miller, M. (1993). Induction of hepatic bilirubin and drug metabolizing enzymes by individual herbs present in the traditional chinese medicin, yin z huan. Develop. Pharm.Therap. 20(3-4), 186-194.
Yoshikawa, M.; Morikawa, T.; Murakami, T.; Toguchida, I.; Haarima, S.; Matsuda, H.;(1999). Medicinal flowers. I. Aldose reductase inhibitors and three new eudesmaanee- type sesquiterpenses, Kikkanols A, B, and C, from the flowers of *Chrysanthemum indicum L*. Chem. Pharm. Bull. 47 (3), 340-345.
Yoshino, M.; Haneda, M.; Naruse, M.; and al. (1999). Prooxidant activity of flavonoids: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. Mol Genet Metab. 68(4), 468-72
Young, E.C.; Kim, S. G.; Lee, J. W.; Yoo, J. K.; Shin, J. K.; Doo, N. K.; (1996). Suppression of rat hepatic cytochrom P450 2E1 expression by Isopropyl. 2- (1,3- dithioctane- 2- ylidene)- 2- [N- (4- methyl- thiazol- 2- yl) carbamoyl] acetate (YH 439), an experimental hepatoprotectant: protective role against hepatic injury. Biochem, Pharmacol, 52, 1219- 1225.
Yue, J.; Peng, R.X.; Yang, J.; Kong, R.; Liu, J. (2004). CYP2E1 mediated isoniazid-induced hepatotoxicity in rats. Acta Pharmacologica Sinica 25(5), 699–704.
Yun- Zhen, H.; Tong-Wei, Y.; (2004). In vitro metabolism and inductive or inhibitive effect of DL111 on rat cyiochrome P4501A enzyme. Chemico- Biological Interactions 147, 109- 117.
Yung, C.H.; Jeong, H.G.; Jhoun, J. W.; and Guengrich, F.P. (1995). Non- specific inhibition of cytochrome P450 activities by chlorophyllin in human and rat liver microsomes. Carcinofenesis 16, 1437- 1440.
Zarati , M . ; Szabo , I . (1995) . the mitochondrial permeability transition. Biochem. Biophys. Acta 1241 , 139 – 176 .

Zhai, S.; Dai, R.; Wei, X.; Freidman, F. K.; Vestal, R. E.; (1998). Inhibition of methoxy reorufin de methylae activity by flavonoids in human liver microsome. Life sci, 63 (8), 119- 123.
Zhao, C.; Ruan, H.; Lei, Y.; Wu, Y.; Voelter, W.; Jung, A.; Schick, M. (1996). Inhibition of the development of plasmodium yoelii in exoerythrocytic stage in rodents (rats) with *Chrysanthemum morifolium.* J. Tongji Med. Univ. 16(4), 200-202.
Zhu, B.T.; Ezell, E.L.; Liehr, J.G. (1994). Catechol-O-methyltransferase-catalysed rapid O-methylation of mutagenic flavonoids: metabolic inactivation as a possible reason for their lack of carcinogenicity in vivo. J. Biol. Chem. 269: 292-299.
Zhu, **S.; Yang, Y.; Yu, H.; Ying, Y.; Zou, G. (2005)**. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum* Journal of Ethnopharmacology 96 151-158.
Ziegler DM. (1985). Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. Annu. Rev. Biochem. 54:305-29.
Zilly, W, D.; Breimer, D.; Richer, E. (1977). Stimulation of drug metabolism by refampicin in patients with cirrhosis or cholestasisi measured by increased hexarbarbital and tol butamide clearance Eur. J. Clin. Pharmacol. 11, 287- 293.
Zini, R.; Morin, C.; Bertelli, A.; and al. (1995). Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain, Drugs Exp. Clin. Res. 25, 87-97
Zoratti, M.; Szabo, I. (1995). The mitochondrial permeability transition. Biocim. Biophys. Acta.; 1241: 139-176
Zou, L.; Henderson, G.L.; Harkey, M. R.; Sakai, Y.; Li. A (2004). Effect of Kava (Kava-kava, Awa, Yaqona, piper methysticum) on c-DNA expressed cytochrome p450 enzymes and human cryopreserved hepatocytes. Phytomedicine 11: 285- 294.